



Synthèse et évaluation d'un candidat vaccin à 3 composantes (Agoniste TLR7-glycopeptoïde-OVA 323-339) dans le cadre d'une application en immunothérapie anti-tumorale

Thomas Szekely

► To cite this version:

Thomas Szekely. Synthèse et évaluation d'un candidat vaccin à 3 composantes (Agoniste TLR7-glycopeptoïde-OVA 323-339) dans le cadre d'une application en immunothérapie anti-tumorale. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22476 . tel-01281307

HAL Id: tel-01281307

<https://theses.hal.science/tel-01281307>

Submitted on 2 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'Ordre : D.U. 2476

UNIVERSITE BLAISE PASCAL – CLERMONT-FERRAND II

(U.F.R. Sciences et Technologies)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES (N° 178)

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Chimie Organique et Biologique)

PAR

Thomas SZEKELY

Ingénieur chimiste de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand

**SYNTHESE ET EVALUATION D'UN CANDIDAT VACCIN A
TROIS COMPOSANTES (AGONISTE TLR7-GLYCOPEPTOIDE-
OVA 323-339) DANS LE CADRE D'UNE APPLICATION EN
IMMUNOTHERAPIE ANTI-TUMORALE**

Soutenue publiquement le 10 juillet 2014, devant la Commission d'Examen :

Président :

Jean-Michel CHEZAL, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand I.

Rapporteurs :

Agnès DELMAS, Directeur de Recherche, CBM Orléans.

Denis POSTEL, Professeur, Université Jules Verne de Picardie.

Examineurs :

Sylvie BAY, Chargé de Recherche, Institut Pasteur de Paris.

Claude TAILLEFUMIER, Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.

Olivier ROY, Maître de Conférences, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.

Institut de Chimie de Clermont-Ferrand – UMR CNRS 6296

24, avenue des Landais – 63177 AUBIERE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Anne-Marie Delort, Directrice de Recherche au CNRS et directrice de l'ICCF, pour m'avoir accueilli au laboratoire pour que j'y effectue ma thèse.

Je remercie vivement Claude Taillefumier, Professeur à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son groupe de recherche, pour m'avoir encadré tout au long de ma thèse, pour sa disponibilité ainsi que pour ses conseils et pour la confiance qu'il m'a accordée. Un grand merci pour son aide précieuse lors des réactions de CuAAC.

Je tiens à adresser des remerciements particulièrement importants à Olivier Roy, Maître de Conférences à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, pour m'avoir co-encadré pendant ces trois années. C'était un réel plaisir de travailler à tes côtés. Un grand merci pour ta rigueur, tes conseils et pour nos discussions scientifiques ou pas (notamment sur le football...).

Je souhaite remercier Jean-Michel Chezal, Professeur à l'Université d'Auvergne (UMR INSERM 990) pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie Agnès Delmas, Directrice de Recherche au Centre de Biophysique Moléculaire à Orléans et Denis Postel, Professeur à l'Université Jules Verne de Picardie à Amiens, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également Sylvie Bay, Chargé de Recherche à l'Institut Pasteur de Paris, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je voudrais exprimer mes vifs remerciements aux personnes avec qui nous avons collaboré pour ce projet. En premier lieu, je remercie le Professeur Claude Leclerc, Responsable de l'Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie à l'Institut Pasteur de Paris (INSERM 1041). Un grand merci pour avoir gentiment accepté de répondre à mes nombreuses questions en matière d'immunologie. Au sein de l'équipe du Pr. Claude Leclerc, je remercie aussi Richard Lo-Man, Chargé de Recherche et Edith Dériaud, Ingénieur, pour l'ensemble des évaluations biologiques de nos structures. Je remercie très chaleureusement Vincent Aucagne, Chargé de Recherche au Centre de Biophysique Moléculaire à Orléans, pour son aide précieuse et ses conseils avisés pour le couplage du peptide OVA 323-339. Je souhaite vivement remercier Bernadette Bouchon, Professeur à l'Université d'Auvergne (UMR INSERM 990), pour avoir réalisé les analyses par MALDI-TOF de nos édifices complexes. Pour finir, je remercie Régis Vanderesse, Chargé de Recherche au CNRS (INPL Nancy), pour nos discussions constructives sur la synthèse du peptide OVA 323-339.

Je tiens à remercier les autres membres de l'équipe Bioconjugués/Peptidomimétiques, Sophie Roy-Faure, Pierre-Henri Elchinger et Gaetano Angelici, pour les discussions riches et les conseils qu'ils m'ont dispensés. Je remercie tout particulièrement Camille Collange, stagiaire de M2 au laboratoire pendant ma première année de thèse qui a participé à l'évolution de ce travail.

Au sein du laboratoire, je voudrais remercier Aurélie Job, technicienne, pour sa gentillesse et pour m'avoir énormément aidé lors des analyses par HPLC. Je remercie également Bertrand Légeret et Angélique Abila pour le temps qu'ils ont consacré à l'analyse de mes produits en spectrométrie de masse. Je remercie Vincent Théry pour sa patience lors de mes difficultés en informatique et pour son aide lors des TD d'O2i. Je tiens à remercier Francis Giraud, avec qui j'ai eu la chance d'assurer des séances de TP et de TD (et qui est mon fournisseur officiel en acétonitrile anhydre) ainsi que Federico Cisnetti dont j'ai pu admirer la passion pour la chimie au cours de nos discussions le vendredi soir.

J'en viens à remercier tous les doctorants et les post-doctorants que j'ai pu côtoyer pendant ces trois années: Cécile, Murielle, Nadia, Nicolas, Anthony, Aurélien, Michaël, Claire, Mohamed, Virginie, Christelle, Pierre-Alain, Valentin, Yannick (j'ai adoré ta blouse de véto). Un grand merci à Carlos, pour ses conseils, son immense bonne humeur. Je remercie tout particulièrement Julianne et Israel, pour leur gentillesse, pour les bonnes soirées passées ensemble, les cinés et surtout pour avoir accepté de participer à mon mariage.

Enfin, je souhaite remercier ma famille qui m'a toujours soutenu et encouragé pendant ces trois années de thèse. Un grand merci à mon père, à ma mère et à ma femme Yuanyuan...sans qui tout cela ne serait pas possible.

"好学近乎知 (hao xue jin hu zhi)", *Celui qui aime apprendre est bien près du savoir.*

Confucius

La rigueur vient toujours à bout de l'obstacle.

Léonard de Vinci

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION.....	3
CHAPITRE I: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. IMMUNOTHERAPIE ANTI-TUMORALE	9
A. Le cancer	9
1. Origine et terminologie.....	9
2. Glycosylation et cancer.....	11
3. Influence des mucines et de leur <i>O</i> -glycosylation sur le développement tumoral.....	14
B. Le système immunitaire	19
1. Le système immunitaire inné.....	20
2. Le système immunitaire adaptatif.....	24
3. Les anticorps: effecteurs de l'immunité humorale	29
C. Vaccination anti-tumorale	31
1. Contraintes associées au développement de vaccins à base de TACAs.....	33
2. Vaccins à base de TACAs conjugués à une protéine porteuse	36
3. Vaccins synthétiques à deux composants	46
4. Vaccins synthétiques à composants multiples	56
II. OBJECTIFS ET PRESENTATION DE L'ETUDE	59
CHAPITRE II: ACCES AUX PLATEFORMES β-TRIPEPTOÏDES <i>O</i>- ET <i>S</i>-GLYCOSYLEES	65
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES PEPTOÏDES	68
A. Découverte et intérêt des peptoïdes	68
1. Les α -peptoïdes	68
2. Les β -peptoïdes.....	70
3. Autres composés apparentés.....	72
B. Aspect structural.....	72
C. Applications des peptoïdes	75
II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES GLYCOPEPTOÏDES	76
A. Des glycopeptides aux glycopeptoïdes.....	76
B. Synthèse de composés glycopeptidomimétiques.....	77
1. Glycopeptoïdes <i>N</i> -liés.....	78
2. Glycopeptoïdes <i>O</i> -liés	79
3. Glycopeptoïdes <i>C</i> -liés.....	81
4. La stratégie <i>N</i> -alkylaminoxy.....	82
C. Accès aux plateformes peptoïdes multivalentes	83
1. Approches itératives	83
2. Post-modifications chimiques - Ligation par CuAAC sur support	86
D. Les β -glycopeptoïdes	88

III.	ACCES AUX PLATEFORMES β -TRIPETTOÏDES <i>O</i> -GLYCOSYLEES	91
A.	Synthèse des monomères amines	92
1.	Optimisation de la synthèse du monomère mannosylé 2.12	92
2.	Application à la synthèse du monomère GalNAc 2.13	97
B.	Méthode submonomère en solution.....	99
1.	Optimisations initiales sur la synthèse des β -peptoides.....	99
2.	Application à la synthèse des plateformes β -tripeptoides <i>O</i> -glycosylées	100
3.	Conclusion de l'étude.....	103
C.	Méthode monomère en solution	104
1.	Optimisations à partir des glycoconjugués <i>O</i> -mannosylés	104
2.	Application à la synthèse des glycoconjugués <i>O</i> -GalNAc	110
3.	Déprotection des unités saccharidiques	112
4.	Conclusion de l'étude.....	112
IV.	ACCES AUX PLATEFORMES β -TRIPETTOÏDES <i>S</i> -GLYCOSYLEES	113
A.	Synthèse des α -thiosucres peracétylés	115
1.	Synthèse de l' α -thiomannopyranose 2.41	115
2.	Synthèse de l' α -thioGalNAc peracétylé 2.42.....	116
B.	Accès à la plateforme β -tripeptoides <i>N</i> -allyle 2.43.....	118
C.	Ligation multivalente par TEC.....	120
1.	Etudes bibliographiques.....	120
2.	Mise au point des conditions de couplage	123
D.	Déprotection des unités saccharidiques.....	127
E.	Conclusion de l'étude	127

CHAPITRE III: COUPLAGE DES PLATEFORMES AVEC L'AGONISTE DU RECEPTEUR TLR7 129

I.	CONJUGAISON DE L'AGONISTE DU TLR7 AVEC L'ESPACEUR.....	135
A.	Voie de synthèse générale de l'agoniste du TLR7 (3.7)	135
B.	Essais de couplage avec l'espaceur.....	137
II.	CONJUGAISON DES PLATEFORMES β -TRIPETTOÏDES GLYCOSYLEES	139
III.	CONCLUSION DE L'ETUDE	141

CHAPITRE IV: CONJUGAISON DU PEPTIDE OVA 323-339 143

I.	CONJUGAISON PAR COUPLAGE PEPTIDIQUE	147
A.	Essais avec des sucres protégés.....	147
B.	Essai avec des sucres libres	150
II.	CONJUGAISON DE TYPE 1,2,3-TRIAZOLE PAR CUAAC.....	154
A.	Rappels bibliographiques	154
B.	Synthèse des édifices fonctionnalisés par un alcyne	156
C.	Essais avec le peptide fonctionnalisé par un azoture.....	162
III.	CONCLUSION DE L'ETUDE.....	171

CHAPITRE V: TESTS IMMUNOLOGIQUES.....	173
I. TESTS IMMUNOLOGIQUES <i>IN VITRO</i>	177
A. Tests d'adjuvantité	177
B. Tests d'antigénité T.....	178
C. Tests d'antigénité B	181
II. TESTS IMMUNOLGIQUES <i>IN VIVO</i>	183
A. Tests d'adjuvantité	183
B. Tests d'immunogénité T	184
C. Tests d'immunogénité B	186
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	189
PARTIE EXPERIMENTALE	193
I. SYNTHESES ORGANIQUES	195
II. TESTS IMMUNOLOGIQUES.....	293
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	299

Liste des abréviations

ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
APC: Antigen-Presenting Cell
BCR: B-Cell Receptor
BMDC: Bone Marrow derived Dendritic Cell
Boc: *tert*-butyloxy carbonyl
BSA: Bovin Serum Albumin
Cbz: Benzyloxycarbonyl
CCM: Chromatographie sur Couche Mince
CDC: Complement-Dependent Cytotoxicity
CFA: Complete Freund's Adjuvant
CFSE: Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CLR: C-type Lectin Receptor
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COSY: COrrelation SpectroscopY
CTL: Cytotoxic T Lymphocyte
CuAAC: Copper-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition
DBU: 1,8-DiazaBicyclo[5.4.0]Undéc-7-ène
DC: Dendritic Cell
DCC: Dicyclohexylcarbodiimide
DCM: Dichlorométhane
DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin
DCU: Dicyclohexylurée
DIC: *N,N'*-diisopropylcarbodiimide
DIPEA: Diisopropyléthylamine
DMAP: 4-diméthylaminopyridine
DME: Diméthoxyéthane
DMF: Diméthylformamide
DMSO: Diméthylsulfoxyde
DMTST: triflate de diméthyl(méthylthio)-sulfonium
DPAP: 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone
EDCI: 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI: Ionisation par électrospray
Fmoc: Fluorénylméthoxyloxycarbonyl
GalNAc: N-acétylgalactosamine
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GP: Groupement Protecteur
HATU: 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate
HEPES: acide *N*-2-hydroxyéthylpipérazine-*N'*-2-éthane sulfonique (tampon)
HFIP: Hexafluoroisopropanol
HOBt: *N*-hydroxybenzotriazole
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HR-MS: High Resolution-Mass Spectrometry
HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence
IBCF: Chloroformiate d'isobutyle
Ig: Immunoglobuline
IFN: Interféron

IL: Interleukine
 IR: Infra-Rouge
 KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin
 Le: Lewis
 LS-C: Cellules souches leucémiques
 LT CD4⁺: Lymphocyte T CD4⁺ (ou Lymphocyte T_H)
 MAG: Multiple Antigenic Glycopeptide
 MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionisation, Time-Of-Flight
 Man: Mannose
 MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7 (lignée de cellules tumorales mammaires)
 MGL: Macrophage Galactose C-type Lectin
 MMR: Macrophage Mannose Receptor
 MUC: Mucine
 NK: Natural Killer
 NMM: *N*-méthylmorpholine
 NMP: *N*-méthyl-2-pyrrolidone
Nspe: (S)-*N*-(1-phenylethyl)glycine
 OVA: Epitope peptidique T_H issu de l'ovalbumine
 PADRE: Pan-DR Epitope (Epitope peptidique T_H)
 PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern
 Pd/C: Palladium sur Charbon
 PPA: Acide polyphosphonique
 PRR: Pattern Recognition Receptor
 PV: Epitope peptidique T_H issu du virus de la polio
 PyBOP: benzotriazol-1-yl-oxytrypyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
 PyBroP: Bromo-tri-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
 RAFT: Regioselectivity Adressable Functionalized Template
 RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
 T.A: Température Ambiante
 TACA: Tumor-Associated Carbohydrate Antigen
 TCR: T-Cell Receptor
 TEA: Triéthylamine
 TEC: Thiol-Ene Coupling
 TF: Thompsen-Friedenreich
 TFA: Trifluoroacetic acid
 THF: Tétrahydrofurane
 THPTA: Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine
 TLR: Toll-Like Receptor
 TMS-Cl: Chlorure de triméthylsilyle
 Tn: Thompsen-nouveau
 TR: Tandem Repeat
 TT: Epitope peptidique T_H de la toxine tétanique
 VLP: Virus-Like Particule
 UV: Ultra-Violet

Introduction

Suite à des glycosylations aberrantes, la plupart des cellules tumorales expriment à leur surface des glycoprotéines inachevées ou modifiées, exposant à l'extérieur des sucres en temps normal masqués. Ces structures ont été identifiées comme étant des antigènes saccharidiques associés aux tumeurs (TACAs). Ce sont des marqueurs des cellules tumorales et leur niveau d'expression est corrélé à l'évolution de la maladie. La caractérisation de ce type d'antigène a ouvert la voie au développement de nouvelles approches en immunothérapie anti-tumorale. Cependant, la conception de candidats vaccins à base de TACAs s'est heurtée à un certain nombre de difficultés. L'immunotolérance acquise par ces antigènes ainsi que leur incapacité à induire une réponse immunitaire robuste, définie par la production d'anticorps IgG et de cellules à mémoire, a alors incité les scientifiques à les conjuguer à des composés dits immuno-stimulants. Parmi eux, nous pouvons retrouver des épitopes peptidiques des cellules T_H et des agonistes des récepteurs Toll (TLRs) exprimés par certaines cellules du système immunitaire inné.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette optique. Ils se sont déroulés à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), au sein de l'équipe SYMPA (Synthèse de Molécules à Potentialités Antitumorales) et plus particulièrement dans la thématique «Bioconjugués/Peptidomimétiques» animée par le Professeur Claude Taillefumier. Les recherches de cette thématique visent à développer de nouvelles chaînes pseudopeptidiques appelées peptoïdes. Ces structures peuvent avoir un intérêt soit comme peptidomimétiques (incorporation de chaînes latérales protéinogènes, propriétés de folding), soit dans le domaine de l'anti-bioadhésion ou encore comme plateformes multivalentes supports de ligands saccharidiques.

Le projet qui m'a été confié était le développement de stratégies de synthèse pour l'élaboration de candidats vaccins à trois composantes. Ces composantes, conjuguées ensemble, sont différemment impliquées dans la stimulation du système immunitaire, et plus particulièrement des cellules dendritiques, des cellules T_H et des cellules B. De part cette action, ces candidats vaccins doivent permettre la sécrétion d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement un antigène saccharidique naturel donné. Cette reconnaissance favorisant alors la destruction des cellules tumorales exprimant l'antigène. Notre choix s'est porté sur l'antigène Tn (GalNAc- α -O-Ser/Thr), le plus simple des TACAs. De ce fait, l'une des composantes envisagées, est une plateforme β -tripeptoïde O- α -GalNAc. C'est une structure utilisée pour mimer le cluster trimérique Tn, généralement retrouvé à l'état natif sur les cellules tumorales. Autour de cette structure ont été ajoutés, un agoniste puissant du récepteur TLR7 (exprimé par les cellules

dendritiques) et le peptide OVA 323-339 (épitope des cellules T_H). Le potentiel immunogène de l'édifice ainsi obtenu a été, au final, évalué par l'équipe du Pr. Claude Leclerc à l'Institut Pasteur de Paris (INSERM 1041). D'autre part, les liaisons *S*-glycosidiques étant plus résistantes aux processus de dégradations protéolytiques et métaboliques que les liaisons *O*-glycosidiques, nous avons également envisagé de développer des constructions présentant les motifs *S*- α -GalNAc.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique couvrant différents thèmes utiles à la compréhension du sujet. Dans un premier temps, nous évoquerons les relations entre glycosylation et cancer aboutissant à l'apparition des antigènes TACAs, puis nous donnerons quelques rappels sur le fonctionnement de notre système immunitaire. Nous mettrons notamment en évidence, le rôle primordial des cellules dendritiques dans le cadre d'une approche d'immunothérapie anti-tumorale. Ensuite, nous présenterons l'évolution durant ces dernières années, dans la conception de candidats vaccins à base de TACAs. Nous parlerons, entre autre, des travaux de S. J. Danishefsky, C. Leclerc et G-J. Boons, dont les résultats en matière de tests pré-cliniques et cliniques sont à l'origine de nombreuses avancées dans ce domaine.

Dans le deuxième chapitre, la mise au point de plusieurs méthodes de synthèse en solution permettant d'accéder aux plateformes β -tripeptoides *O*- et *S*-glycosylées sera exposée. Nous utiliserons des méthodes caractéristiques de la synthèse des peptoides et une autre facilitant la post-modification de chaînes latérales simples.

Dans le troisième chapitre, différentes conditions de couplage peptidique seront testées de façon à coupler les plateformes β -glycopeptoides à l'agoniste du récepteur TLR7.

Dans le quatrième chapitre, une étude des modes de conjugaison du peptide OVA 323-339 aux édifices glycosylés précédemment obtenus, sera abordée. Des essais de couplage peptidique et le recours à la ligation non native CuAAC seront décrits.

Le cinquième chapitre de ce manuscrit correspond aux évaluations immunologiques réalisées *in vitro* et *in vivo*, à l'Institut Pasteur, dont les résultats seront discutés.

Nous dresserons finalement un bilan des ces trois années de recherche et nous mettrons en relief les perspectives qui seront développées dans la suite du projet.

Chapitre I: Introduction bibliographique

I. Immunothérapie anti-tumorale

A. Le cancer

1. Origine et terminologie

Dans les organes et les tissus normaux, il existe un équilibre habituellement maintenu entre la prolifération et la mort cellulaire. On parle ici d'homéostasie des tissus sains. Les cellules matures qui composent notre organisme ont donc une durée de vie donnée; lorsqu'elles meurent, de nouvelles sont générées à partir de différents types de cellules souches. Néanmoins, il arrive que cet équilibre soit rompu et que certaines cellules ne répondent plus aux mécanismes normaux de contrôle de la croissance. Ces dernières engendrent alors des clones de cellules qui peuvent atteindre une taille considérable et conduire à une tumeur ou néoplasme.

Le terme de cancer fait référence spécifiquement à une tumeur maligne qui a la capacité de croître indéfiniment et de devenir invasive. A l'inverse, une tumeur bénigne ne peut continuer à croître et n'envahit pas les tissus sains environnants. Les tumeurs malignes peuvent donner naissance à des métastases (Figure 1.1). Ce sont de petits groupes de cellules cancéreuses qui quittent la tumeur et diffusent par les vaisseaux sanguins et lymphatiques afin d'envahir d'autres tissus sains où ils peuvent continuer à proliférer. Ainsi, une tumeur primaire peut engendrer une tumeur secondaire au niveau d'un autre site. La transformation maligne (induction du cancer) est un processus en plusieurs étapes faisant généralement appel à des mutations ou à des réarrangements génétiques.

Le classement des tumeurs malignes (ou cancers) est réalisé en fonction de l'origine embryonnaire du tissu dont dérive la tumeur. On appelle carcinomes, les tumeurs qui se développent dans les tissus endodermiques ou ectodermiques (plus particulièrement la peau ou la bordure épithéliale des organes internes et des glandes). Plus de 80% des tumeurs sont des carcinomes. De ce fait, la majorité des cancers du côlon, du sein, de la prostate et du poumon sont des carcinomes. Par ailleurs, les leucémies et les lymphomes sont des tumeurs malignes touchant les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les sarcomes, eux, dérivent des tissus conjonctifs mésodermiques, tels que les os, la graisse et les cartilages.

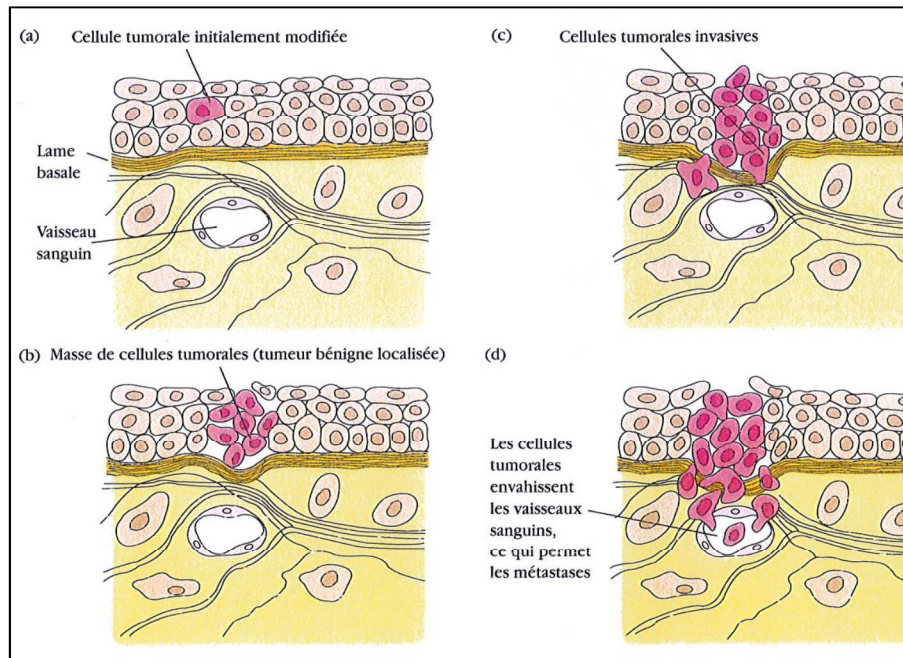


Figure 1.1: Développement du caractère invasif des tumeurs et formation des métastases.
D'après Kindt et al.¹

Actuellement il existe plusieurs traitements traditionnels utilisés contre les cancers tels que la chirurgie locale ainsi que trois grands types de traitements adjuvants (post-opératoire) ou néo-adjuvants (pré-opératoire), que sont la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. Néanmoins, ces approches, bien qu'apportant des bénéfices certains aux patients, ne sont pas dénués de lourds effets secondaires et d'un manque d'efficacité dans la neutralisation des métastases. L'élaboration de nouvelles stratégies pour surmonter ces difficultés et leur association pertinente avec les thérapies classiques représentent donc une voie d'avenir.

L'objectif est alors de cibler une anomalie biologique considérée comme responsable de la prolifération tumorale ou de l'évolution clinique vers des formes plus agressives. Ceci requiert une meilleure connaissance de ces anomalies. De ce fait, il a été montré que des modifications dans l'expression ainsi que dans les structures osidiques des glycoconjugués membranaires (glycoprotéines et glycolipides) étaient associées au processus de cancérisation.² Ces modifications favorisent l'apparition d'antigènes associés aux tumeurs qui diffèrent des antigènes spécifiques des tumeurs, puisqu'ils peuvent aussi être présents sur les cellules saines (avec de faibles concentrations). Par définition, un antigène est une substance capable d'entraîner une réponse immunitaire spécifique. Ce sont des marqueurs tumoraux. C'est dans cette optique que

¹ Kindt, T. J.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby* 2008, Edition Dunod, 684 p.

² Guillot, J.; Guerry, M.; Konska, G.; Caldefie-Chezet, F.; de Latour, M.; Penault-Llorca, F. Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation: cas des carcinomes mammaires. *Bulletin du Cancer* 2004, 91, 141-158.

de nombreuses approches d'immunothérapies anti-tumorales se sont développées ces dernières années. Le but étant de stimuler nos défenses en les dirigeant spécifiquement contre ces composés antigéniques afin d'aider au rejet de la tumeur.

2. Glycosylation et cancer

a. Généralités

La glycosylation est un phénomène universel qui occupe une place à part parmi les douze modifications post-traductionnelles identifiées à ce jour. Une modification post-traductionnelle permet de réguler l'activité d'une protéine et est réalisée, le plus souvent, par une enzyme après sa synthèse ou au cours de sa vie dans la cellule. Les oligosaccharides peuvent présenter une extrême variabilité structurale. Cette hétérogénéité dépend de leur taille, de leur composition en monosaccharides, de leur séquence, des anoméries de liaison et enfin des éventuels branchements observés. Ceci confère aux molécules porteuses de glycanes une grande diversité d'un point de vue structural et donc fonctionnel.² La glycosylation permet d'aboutir à la formation de molécules biologiques telles que les glycoprotéines et les glycolipides. Les glycoprotéines sont très répandues dans l'ensemble des organismes vivants (animaux mais aussi plantes, champignons et bactéries). Ainsi ces molécules multifonctionnelles peuvent jouer le rôle d'enzyme, d'hormone, de cytokine ou d'anticorps. Elles peuvent être aussi bien de surface qu'intracellulaires.

En ce qui concerne les glycoprotéines, il existe deux grands types de glycosylation: la *N*-glycosylation dans laquelle la fonction amide primaire de la chaîne latérale de l'asparagine intervient dans une liaison avec le premier ose de la chaîne glycanique et la *O*-glycosylation mettant en jeu les groupements hydroxyles des aminoacides de type sérine et thréonine.³ Plus particulièrement, les *O*-glycanes sont également classés en deux catégories selon la nature du premier sucre lié à l'acide aminé (sérine ou thréonine) de la protéine:

- type mucine: le premier sucre lié est la *N*-acétyl-galactosamine (GalNAc) et la plupart des résidus sérine et thréonine sont glycosylés.
- type non mucine: les premiers sucres liés sont principalement le fucose, le glucose ou la *N*-acétyl-D-glucosamine.

³ Dwek, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical Reviews* **1996**, 96, 683-720.

Les effets de la *O*-glycosylation des protéines se manifestent à différents niveaux et couvrent un large spectre de rôles biologiques, la plupart essentiels.^{4,5} De manière générale, les composés *O*-glycoconjugués interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, de la différenciation, de l'adhésion et de l'apoptose (mort cellulaire programmée).

b. Les glycoprotéines de type mucine

Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (>500 KDa) porteuses de milliers de chaînes principalement *O*-glycaniques (Figure 1.2). Les acides aminés sérine et thréonine attachés à ces chaînes saccharidiques, se trouvent au niveau de motifs répétés en tandem (*tandem repeats* TRs). Les séquences de ces TRs, leur taille ainsi que leur nombre de répétitions varient d'une mucine à l'autre. Les mucines, produites par les cellules épithéliales, sont les composantes majoritaires du mucus. Celui-ci recouvre la lumière des organes creux de l'organisme tels que le tractus gastro-intestinal, les voies respiratoires ou l'appareil génital.⁶ Ses propriétés viscoélastiques et ses fonctions protectrices dépendent donc de ces glycoprotéines. En effet ces dernières jouent un rôle clé dans l'hydratation des surfaces épithéliales qui est essentielle pour la lubrification et le fonctionnement intrinsèque des conduits. De plus, elles sont impliquées dans la protection des cellules épithéliales vis-à-vis des agressions d'origine endogène ou exogène (pH acide, action des protéases digestives, abrasion mécanique lors du passage du bol alimentaire, attaque microbienne...)⁶.

La biosynthèse des chaînes *O*-glycaniques débute par l'action d'une famille d'enzymes appelée polypeptide α -GalNAc transférase (ppGalNAcTs) qui transfère la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) à partir d'un sucre donneur UDP-GalNAc sur un résidu de type sérine ou thréonine.² La structure GalNAc- α -*O*-sérine/thréonine obtenue est le carrefour commun pour la construction de différents «cores» dont la synthèse met en jeu un très grand nombre d'enzymes de type glycosyltransférase (Figure 1.2). Ce sont des structures de base à partir desquelles il est possible d'ajouter deux autres parties saccharidiques. Tout d'abord une région squelette formant

⁴ Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.

⁵ Davis, B. C. Synthesis of Glycoproteins. *Chemical Reviews* **2002**, 102, 579-601.

⁶ Aksoy, N.; Faruk Akinci, O. Mucin Macromolecules in Normal, Adenomatous, and Carcinomatous Colon: Evidence for the Neotransformation. *Macromolecular Bioscience* **2004**, 4, 483-496.

l'ossature (linéaire ou ramifiée) et une région périphérique terminale. Les chaînes *O*-glycaniques peuvent atteindre 80% de la masse moléculaire totale de la glycoprotéine.⁷

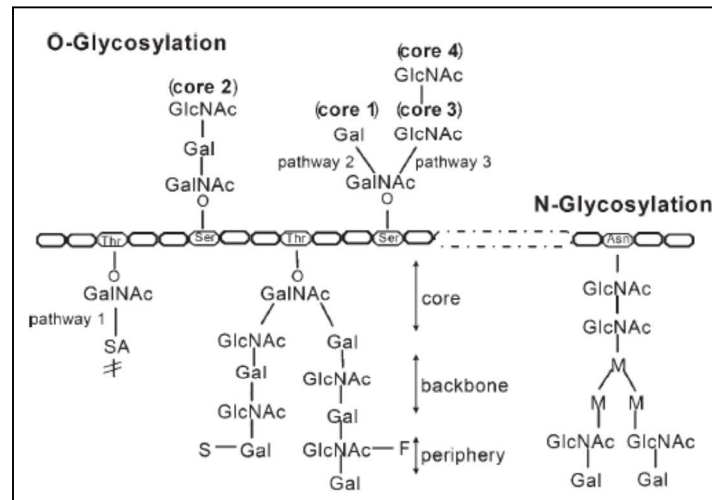


Figure 1.2: *O*- et *N*-glycosylations des mucines. D'après Aksoy et al.⁶

En fonction de leurs caractéristiques et de leur devenir physiologique, les mucines sont classées en deux groupes: les mucines sécrétées et celles liées aux membranes. Dans ce dernier groupe, existe les mucines MUC1 caractérisées par de nombreuses données bibliographiques. Les MUC1 sont des glycoprotéines transmembranaires détectées pour la première fois dans le lait humain. Elles sont exprimées à la surface apicale des épithélia simples et glandulaires tels que les glandes salivaires, le pancréas et le sein.⁸ Elles sont exprimées également par les lymphocytes T^{8,9} et les cellules dendritiques activées.¹⁰ Le domaine extracellulaire des MUC1 est formé d'un nombre variable d'unités répétitives TRs de 20 acides aminés, présentant chacune 5 sites potentiels de *O*-glycosylation. La séquence d'un TR est la suivante où les résidus S et T représentent respectivement les acides aminés sérine et thréonine:¹¹

GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP

⁷ Brooks, S. A.; Carter, T. M.; Royle, L.; Harvey, D. J.; Fry, S. A.; Kinch, C.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. Altered Glycosylation of Proteins in Cancer: What Is the Potential for New Anti-Tumour Strategies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, 8, 2-21.

⁸ Agrawal, B.; Gendler, S. J.; Longenecker, B. M. The biological role of mucin in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Molecular Medicine today* **1998**, 4, 397-403.

⁹ Agrawal, B.; Krantz, M. J.; Parker, J.; Longenecker, B. M. Expression of MUC1 Mucin on Activated Human T Cells: Implications for a Role of MUC1 in Normal Immune Regulation. *Cancer research* **1998**, 58, 4079-4081.

¹⁰ Wykes, M.; MacDonald, K. P. A.; Tran, M.; Quin, R. J.; Xing, P. X.; Gendler, S. J.; Hart, D. N. J.; McGuckin, M. A. MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* **2002**, 72, 692-701.

¹¹ Ho, S. B.; Shekels, L. L.; Toribara, N. W.; Kim, Y. S.; Lyftogt, C.; Cherwitz, D. L.; Niehans, G. A. Mucin Gene Expression in Normal, Preneoplastic, and Neoplastic Human Gastric Epithelium. *Cancer Research* **1995**, 55, 2681-2690.

3. Influence des mucines et de leur *O*-glycosylation sur le développement tumoral

Une altération chronique ou permanente de la production des mucines et/ou modifications de leurs caractéristiques biochimiques peut avoir des conséquences graves sur le comportement et le devenir d'une cellule. Ainsi, des modifications dans leur expression et/ou des *O*-glycosylations aberrantes sont assimilées à différents types de pathologies et plus particulièrement au cancer.^{12,13} L'ensemble de ces changements, non présents à la surface des cellules normales, confèrent à la cellule tumorale de nouvelles propriétés telles que:

- la perte de l'inhibition de contact (prolifération incontrôlée).
- la survie cellulaire (résistance à l'apoptose).
- la capacité à s'affranchir des liaisons avec la matrice extracellulaire et avec les autres cellules (perte d'adhérence).
- l'aptitude à éviter le système immunitaire.
- la possibilité de s'arrimer à d'autres tissus sains (établissement d'un site tumoral secondaire).

a. Rôle de la surexpression des mucines: cas des MUC1

C'est dans les années 1980 que les MUC1 ont été définies pour la première fois comme des marqueurs tumoraux du fait de leur détection chez des patientes atteintes de cancers du sein. Par la suite, plusieurs études ont montré l'implication directe des MUC1 surexprimées et parfois issues de *O*-glycosylations altérées dans différents types de cancers (colon⁶, sein¹⁴, pancréas, ovaire et prostate).

Lors des transformations malignes, une surexpression de ce type de mucines membranaires entraîne une perte de polarité des cellules. En effet, ces mucines sont présentes sur l'ensemble de la membrane plasmique des cellules cancéreuses et non plus seulement sur la partie apicale, comme c'est le cas dans les tissus sains. Des interactions entre ces MUC1, certains types de récepteurs (normalement exprimés sur la partie baso-latérale des cellules épithéliales) et des

¹² Hollingsworth, M. A.; Swanson, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer* **2004**, 4, 45-60

¹³ Hakomori, S-H. Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives. *Cancer Research* **1985**, 45, 2405-2414.

¹⁴ Siroy, A.; Abdul-Karim, F. W.; Miedler, J.; Fong, N.; Fu, P.; Gilmore, H.; Baar, J. MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Human Pathology* **2013**, 44, 2159-2166.

molécules effectrices sont alors observées. Ceci permet l'activation de nombreuses voies de signalisation¹⁵ qui contribuent au contrôle de gènes favorisant la prolifération cellulaire¹⁶, l'inhibition de l'apoptose (induite par le stress oxydatif)¹⁷ mais également l'angiogénèse en cas d'hypoxie¹⁸ et la migration des cellules cancéreuses.¹⁹

Les modifications d'expression des MUC1 reconfigurent les propriétés membranaires des cellules cancéreuses. On considère qu'elles agissent comme des molécules anti-adhésives. La surexpression des MUC1 richement glycosylées peut inhiber les interactions cellule-matrice et les interactions cellule-cellule (figure 1.3).¹² Ces fonctions anti-adhésives sont de nature à pouvoir favoriser le détachement des cellules cancéreuses des sites tumoraux originels.

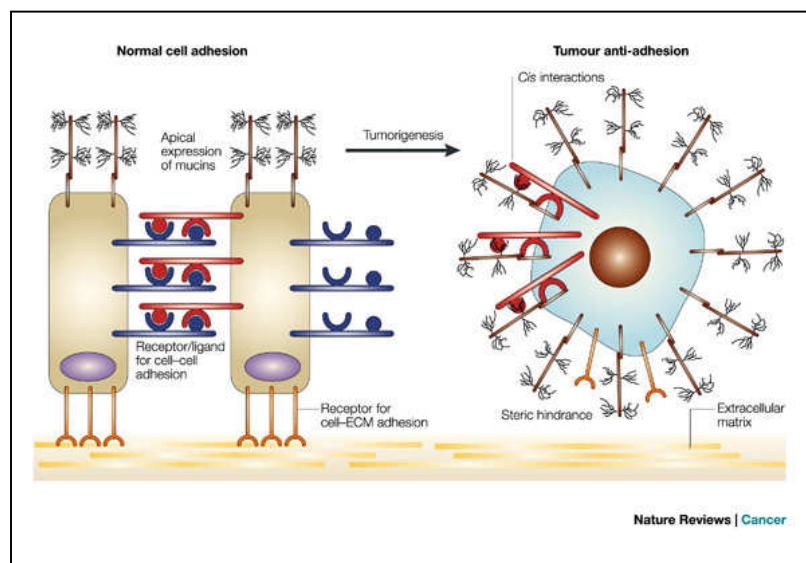


Figure 1.3: Conséquences de la surexpression des mucines sur l'adhérence cellulaire.
D'après Hollingsworth et al.¹²

Néanmoins, la variété des phénomènes dans lesquels ces mucines membranaires sont impliquées et la persistance de zones d'ombres dans leur influence sur le développement cancéreux trahissent l'existence d'un niveau de complexité supérieure. Cette complexité pourrait être due, en partie, aux perturbations observées sur la *O*-glycosylation de ces mucines.

¹⁵ Carraway, K. L.; Ramsauer, V. P.; Haq, B.; Carothers Carraway, C. A. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays* **2003**, 25, 66-71.

¹⁶ Singh, P. K.; Hollingsworth, M. A. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in Cell Biology* **2006**, 16, 467-476.

¹⁷ Yin, L.; Li, Y.; Ren, J.; Kuwahara, H.; Kufe, D. Human MUC1 Carcinoma Antigen Regulates Intracellular Oxidant Levels and the Apoptotic Response to Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, 276, 6061-6064.

¹⁸ Kitamoto, S.; Yokoyama, S.; Higashi, M.; Yamada, N.; Takao, S.; Yonezawa, S. MUC1 enhances hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors. *Oncogene* **2013**, 32, 4614-4621.

¹⁹ Schroeder, J. A.; Adriance, M. C.; Thompson, M. C.; Camenisch, T. D.; Gendler, S. J. MUC1 alters b-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. *Oncogene* **2003**, 22, 1324-1332.

b. Les antigènes saccharidiques associés aux tumeurs

La majorité des tumeurs présentent des mucines mettant en évidence des dérèglements au niveau des processus de *O*-glycosylation.¹² Ces dérèglements sont dus à des dysfonctionnements des enzymes responsables de leur biosynthèse. On peut noter par exemple, dans des lignées cellulaires issues des cancers du sein, une augmentation du taux moyen de glycosylation des TRs. D'autres modifications structurales des mucines ont pour conséquence de mettre en exergue à la surface des cellules tumorales, des épitopes glycaniques en temps normal masqués ou très faiblement exprimés sur des cellules saines. Les épitopes ou déterminants antigéniques sont des parties de l'antigène reconnus par le système immunitaire. Ces épitopes sont des antigènes saccharidiques associés à des tumeurs et sont appelés TACAs (*Tumor-Associated Carbohydrate Antigen*).²⁰ La figure 1.4 décrit les quatre principales classes de TACAs. Certains peuvent être exprimés par les mucines ou par d'autres types de glycoconjugués (glycoprotéines ou glycolipides).

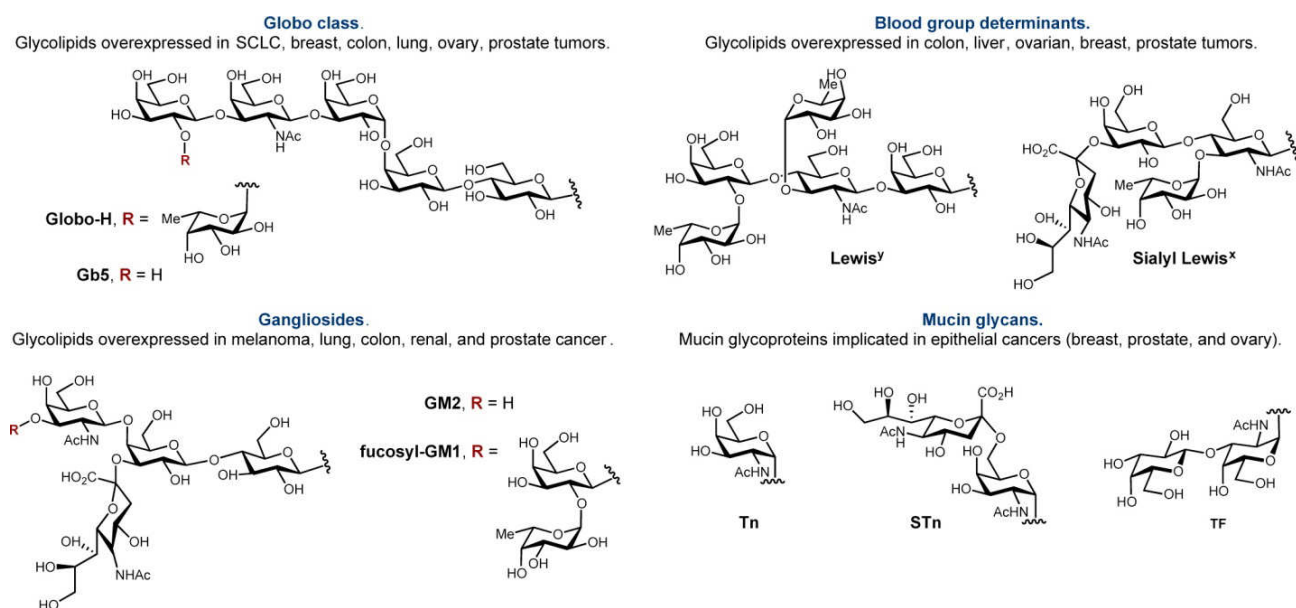


Figure 1.4: Membres les plus représentatifs des 4 classes principales de TACAs. D'après Danishefsky et coll.²¹

On y retrouve d'une part leurs structures et d'autre part les différents cancers dans lesquels ils sont le plus souvent détectés. Sont représentés l'antigène monosaccharidique Tn (Thomsen-nouveau) et deux antigènes disaccharidiques sTn (pour sialyl Tn) et TF (Thomsen-Friedenreich, également noté T).

²⁰ Gildersleeve, J. C.; Wang, B.; Achilefu, S.; Tu, Z.; Xu, M. Glycan array analysis of the antigen repertoire targeted by tumor-binding antibodies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 6839-6843.

²¹ Wilson, M. R.; Danishefsky, S. J. A Vision for Vaccines Built from Fully Synthetic Tumor-Associated Antigens: From the Laboratory to the Clinic. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135, 14462-14472.

Ces structures sont *O*-liées aux mucines (figure 1.5). Suivent les oligosaccharides Globo-H²², Gb5 et les antigènes du groupe sanguin de type Lewis²³ Le^y et sLe^x. Les structures GM2 et fucosyl-GM1 font, eux, parti de la famille des gangliosides.²⁴ Par ailleurs, il est important d'ajouter qu'il existe d'autres antigènes, non représentés ici.

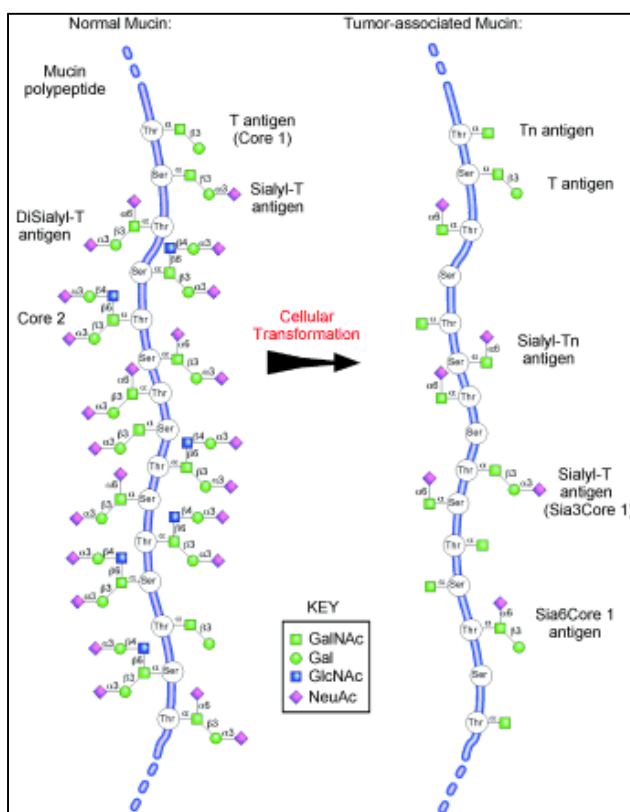


Figure 1.5: Expression des antigènes Tn, sTn et TF par les mucines lors de la transformation tumorale.
D'après Cummings et coll.²⁵

Les modifications concernant les *O*-glycosylations qui peuvent survenir, sont donc variées et complexes. Mais la fréquence de ces modifications semble indiquer que certaines d'entre elles participent à l'augmentation du potentiel invasif des cancers et favorisent la dissémination hématogène des métastases.

²² Chang, W-W.; Lee, C. H.; Lee, P.; Lin, J.; Hsu, C-W.; Hung, J-T.; Lin, J-J.; Yu, J-C.; Shao, L-e.; Yu, J.; Wong, C-H.; Yu, A. L. Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 11667-11672.

²³ Zhang, S.; Zhang, H. S.; Cordon-Cardo, C.; Reuter, V. E.; Singhal, A. K.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. Selection of Tumor Antigens as Targets for Immune Attack using Immunohistochemistry: II. Blood Group-Related Antigens. *International Journal of Cancer* **1997**, *56*, 50-56.

²⁴ Zhang, S.; Cordon-Cardo, C.; Zhang, H. S.; Reuter, V. E.; Alduri, S.; Hamilton, W. B.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. Selection of Tumor Antigens as Targets for Immune Attack using Immunohistochemistry: I. Focus on Gangliosides. *International Journal of Cancer* **1997**, *56*, 50-56.

²⁵ Tongzhong, J.; Otto, V. I.; Cummings, R. D. The Tn Antigen-Structural Simplicity and Biological Complexity. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 1770-1791.

Dans le cadre ma thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'antigène Tn, résidu GalNAc- α -O-sérine/thréonine. Sa structure est relativement simple mais ses aspects biologiques et physiopathologiques paraissent plus complexes.²⁵ Son expression inhabituelle fut dans un premier temps associée à une pathologie chez l'Homme appelée syndrome Tn (trouble hématologique) et ensuite liée au cancer, pour la première fois en 1969. Cette structure osidique altérée des mucines est présente dans au moins 80% des tissus de la grande majorité des cancers²⁶ et signe un mauvais pronostic pour les patients atteints des cancers du sein, de l'estomac et du colon. Son expression est liée à un dysfonctionnement (absence/inactivité) de la β -3-galactosidotransférase (ou synthase-T) qui permet la synthèse de l'antigène TF par addition d'un galactose lié en $\beta 1 \rightarrow 3$ sur le GalNAc- α -O-sérine/thréonine. La présence de Tn peut aussi être associée à un dysfonctionnement de la protéine chaperon Cosmc (*Core 1 β -galactosyltransferase-specific molecular chaperone*)²⁷ qui régule la structuration de la synthase-T. C'est l'élément de base à partir duquel il est possible d'obtenir les autres antigènes des mucines, notamment sTn et TF.

L'antigène Tn est également un antigène carcinoembryonnaire,²⁸ normalement présent au cours du développement embryonnaire (particulièrement sur les tissus épithéliaux et mésothéliaux) puis réprimés lors de la différenciation. Il est malgré tout faiblement exprimé à la surface des cellules normales adultes.²⁹ C'est un important auto-immunogène³⁰ qui joue aussi un rôle important dans la dissémination métastasiante. Il permet aux cellules cancéreuses d'échapper à l'immunosurveillance³¹ et favorise l'adhérence des métastases aux tissus sains³⁰ (appelé «*homing*») grâce à des interactions spécifiques de type lectine-sucre. Cependant de nombreux facteurs restent encore à définir concernant les conséquences pathologiques de l'expression de Tn et son implication dans l'évolution des cancers.

²⁶ Springer, G. F.; Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine* **1997**, 75, 594-602.

²⁷ Wang, Y.; Tongzhong, J.; Ding, X.; Xia, B.; Wang, W.; Xia, L.; He, M.; Cummings, R. D. Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 9228-9233.

²⁸ Barr, N.; Taylor, C. R.; Young, T.; Springer, G. F. Are Pancarcinoma T and Tn Differentiation Antigens?. *Cancer* **1989**, 64, 834-841.

²⁹ Zhang, S.; Zhang, H. S.; Reuter, V. E.; Slovin, S. F.; Scher, H. I.; Livingston, P. O. Expression of Potential Target Antigens for Immunotherapy on Primary and Metastatic Prostate Cancers. *Clinical Cancer Research* **1998**, 4, 295-302.

³⁰ Springer, G. F.; Cheingsong-Popov, R.; Schirmacher, V.; Desai, P. R.; Tegtmeyer, H. Proposed Molecular Basis of Murine Tumor Cell-Hepatocyte Interaction. *The Journal of Biological Chemistry* **1983**, 258, 5702-5706.

³¹ Sealand, E.; van Vliet, S. J.; Bäckström, M.; van den Berg, V. C. M.; Geijtenbeek, T. B. H.; Meijer, G. A.; van Kooyk, Y. The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunology Immunotherapy* **2007**, 56, 1225-1236.

Dans l'ensemble les TACAs sont des marqueurs tumoraux.³² Leur caractérisation présente un intérêt qui est à la fois diagnostique, certains glycotopes sont exprimés avant toutes anomalies cellulaires (par exemple Tn), et pronostique puisque certaines séquences favorisent les métastases.

Des applications thérapeutiques anti-cancéreuses sont envisagées par utilisation d'analogues de sucres bloquant l'activité des enzymes responsables de la formation des épitopes glycaniques potentiellement dangereux. Comme nous l'avons dit précédemment d'autres approches concernent l'immunothérapie. Certaines de ces approches permettent le développement chimique de candidats vaccins à base d'antigènes saccharidiques dans le but de déclencher une réaction immunitaire dirigée spécifiquement contre ces épitopes glycaniques tumoraux.³³ Néanmoins l'élaboration de structures vaccinales efficaces nécessite des connaissances aigues sur les éléments cellulaires et moléculaires qui composent notre système immunitaire.

B. Le système immunitaire

Le système immunitaire est un système de défense remarquablement adaptatif qui nous protège contre de nombreux pathogènes tels que les virus, les bactéries, les champignons et les parasites. Le système immunitaire produit une multitude de cellules et de molécules composant un réseau dynamique et capable de reconnaître spécifiquement puis d'éliminer un grand nombre de micro-organismes étrangers.¹

La reconnaissance immunitaire possède la capacité à pouvoir distinguer les envahisseurs étrangers des composants du Soi (discrimination Soi - non Soi). De plus, celle-ci présente l'aptitude à pouvoir identifier les cellules de l'hôte altérées telles que les cellules infectées par un virus ou les cellules cancéreuses. Généralement, la reconnaissance d'un pathogène engendre une réponse effectrice servant à le neutraliser.

Il existe deux systèmes: l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces deux systèmes collaborent pour protéger l'organisme. Ainsi, des niveaux élevés d'interaction et d'interdépendance ont émergé entre eux. En fait, si un agent pathogène échappe complètement au

³² Reis, C. A.; Osorio, H.; Silva, L.; Gomes, C.; David, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of Clinical Pathology* **2010**, 63, 322-329.

³³ Danishefsky, S. J.; Allen, J. R. From the Laboratory to the Clinic: A Retrospective on Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39, 836-863.

système inné, la réponse du système adaptatif est plus faible. La reconnaissance par le système inné permet de mettre en place une réponse adaptative efficace.

Dans cette partie, nous utiliserons également le terme d'antigène que l'on peut assimiler à un pathogène ou à une molécule soluble étrangère.

1. Le système immunitaire inné

a. Présentation

L'immunité innée est l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires préexistant à une maladie et qui est prêt à l'éliminer. Elle représente la première ligne de défense du système immunitaire. Les éléments de détection du système inné sont capables de faire la discrimination entre le Soi et les antigènes, mais ils ne sont pas spécialisés dans la reconnaissance des différences subtiles entre les molécules étrangères. Ces éléments ne sont donc pas spécifiques d'un antigène donné.

Le système inné comprend des barrières physiques, chimiques et cellulaires. Les principales barrières physiques sont la peau et les membranes des muqueuses. Les barrières chimiques incluent l'acidité des composants de l'estomac et des molécules à activités antimicrobiennes. Lorsqu'un agent pathogène franchit ces barrières anatomiques et physiologiques, la composante cellulaire entre alors en jeu. Elle comprend des cellules dotées de récepteurs membranaires capables d'identifier des motifs structuraux variés et conservés au sein d'une espèce microbienne, mais généralement absents de l'hôte, appelés PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Ces récepteurs comprennent entre autre les récepteurs Toll (TLRs: *Toll-Like Receptors*) dont le rôle est essentiel au sein de nos défenses. Les motifs reconnus sont des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) qui incluent des combinaisons de sucres, des protéines, des molécules portant des lipides et certains motifs d'acides nucléiques. Les réponses immunitaires innées impliquent typiquement la participation de plusieurs acteurs cellulaires clés comme par exemple les cellules NK (*Natural Killer*), les macrophages et les cellules dendritiques (DCs: *Dendritic Cells*). En ce qui concerne les cellules dendritiques, certaines études ont démontré qu'elles jouaient un rôle essentiel, pas seulement au niveau de système inné, mais dans l'ensemble du système immunitaire.

b. Les DCs: lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative

Identifiées pour la première fois en 1868 lors d'une étude anatomique de la peau par Paul Langerhans, les DCs ont été par la suite caractérisées dans leurs fonctions par Ralph M. Steinman et Zanvil A. Cohn en 1973.³⁴ Elles représentent une population hétérogène de cellules ayant comme origine des précurseurs médullaires. Deux grands sous-types ont été mis en évidence, les cellules dendritiques myéloïdes (mDCs) et plasmacytoïdes (pDCs). Les DCs sont très nombreuses dans les tissus, en contact avec le milieu extérieur, dans lesquels elles forment un réseau de cellules sentinelles. On peut les retrouver notamment au sein des épithélium muqueux (bouche, oesophage, poumon, vagin, utérus, vessie...) et dans la peau. Elles sont également présentes dans les organes lymphoïdes.

Tout comme les macrophages et les lymphocytes B, les DCs sont assimilées à des cellules présentatrices d'antigènes (APC: *Antigen-Presenting Cell*) importantes pour l'activation des lymphocytes T et donc pour l'induction des réponses immunitaires envers un antigène (les lymphocytes T et B appartiennent au système adaptatif). Les DCs sont considérées comme les plus efficaces des APCs.^{35,36} Elles expriment constitutivement sur leur membrane de forts taux de molécules de classe I et de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces molécules sont associées à des peptides antigéniques et le complexe résultant est présenté puis reconnu par les lymphocytes T. Les DCs expriment également constitutivement des molécules de co-stimulation telles que B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) qui interagissent avec la molécule CD28 à la surface des lymphocytes T. Tous ces éléments engendrent des signaux intervenant dans la stimulation efficace des lymphocytes T et plus particulièrement des lymphocytes T naïfs (cellules n'étant pas encore entrées en contact avec l'antigène). Les DCs sont donc les seules à pouvoir déclencher une réponse immunitaire primaire envers un antigène nouvellement rencontré. Sur les membranes plasmiques des DCs, on peut aussi retrouver des quantités importantes de molécules d'adhésion comme CD58 (LFA-3) et CD54 (ICAM-1) entraînant des interactions fortes avec les lymphocytes T naïfs. De plus, elles se distinguent morphologiquement par la présence de dendrites (prolongements cytoplasmiques) permettant de multiples contacts simultanés avec beaucoup de lymphocytes (Figure 1.6).

³⁴ Steinman, R. M.; Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *The Journal of Experimental Medicine* **1973**, *137*, 1142-1162

³⁵ Zaba, L. C.; Krueger, J. G.; Lowes, M. A. Resident and "Inflammatory" Dendritic Cells in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2009**, *129*, 302-308

³⁶ Mellman, I.; Steinman, R. M. Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell* **2001**, *106*, 255-258

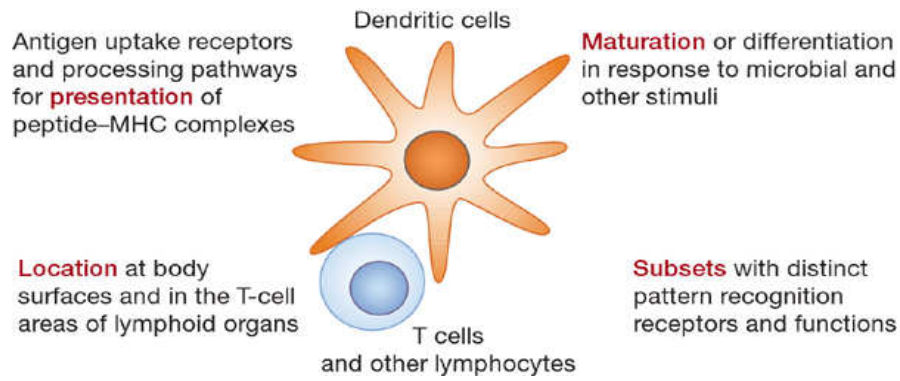


Figure 1.6: Caractérisation des cellules dendritiques. D'après Steinman et al.³⁷

Nb: Les molécules du CMH se divisent en deux classes. Les molécules de classe I du CMH sont exprimées par presque toutes les cellules nucléées et sont associées à des peptides issus d'antigènes endogènes. Les molécules de classe II du CMH ne sont exprimées que par les cellules présentatrices d'antigène et sont associées à des peptides issus d'antigènes exogènes.

Néanmoins, pour pouvoir jouer leur rôle de APC, il est nécessaire qu'elles subissent un processus de maturation. Dispersées dans la majorité des tissus, elles se trouvent dans un état immature et disposent d'une grande capacité à détecter et à capturer les antigènes, mais elles sont de faibles activateurs des lymphocytes T. Différents mécanismes peuvent être utilisés pour la capture: la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose médiée par les récepteurs. Les DCs expriment de nombreux récepteurs qui facilitent l'endocytose comme les récepteurs de type lectine C (CLRs: *C-type Lectin Receptors*).³⁸ Les lectines sont des protéines pouvant se lier aux carbohydrates. Plusieurs CLRs ont été identifiés au niveau des DCs. Par exemple, on peut citer le DEC-205,³⁹ le MMR (*Macrophage Mannose Receptor*) et le DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin*). Le MMR et DC-SIGN sont des récepteurs présentant une grande affinité pour les antigènes mannosylés.⁴⁰

Une fois l'antigène capturé, différents événements s'enchaînent et se succèdent dans la vie des DCs pour aboutir à leur maturation, à l'apprêtement de l'antigène et après migration, à sa présentation aux lymphocytes T. La maturation des DCs peut être déclenchée par différents

³⁷ Steinman, R. M.; Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **2007**, *449*, 419-426.

³⁸ Tang, C-K.; Sheng, K-C.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. Protein/ peptide and DNA vaccine delivery by targeting C-type lectin receptors. *Expert Reviews of Vaccines* **2008**, *7*, 1005-1018.

³⁹ Jiang, W.; Swiggard, W. J.; Heufer, C.; Peng, M.; Mirza, A.; Steinman, R. M.; Nussenger, M. C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **1995**, *375*, 151-155.

⁴⁰ Engering, A. J.; Cella, M.; Fluitsma, D.; Brockhaus, M.; Hoefsmit, E. C. M.; Lanzavecchia, A.; Pieters, J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* **1997**, *27*, 2417-2425.

stimuli issus de l'activation de certains récepteurs PRRs comme les TLRs^{41,42} ou issus de l'interaction avec des cytokines générées par d'autres cellules immunitaires. Les cytokines sont des protéines de faible masse moléculaire ou des glycoprotéines, qui participent à la régulation du développement de nombreuses cellules immunitaires. Parmi elles, nous pouvons citer les interleukines (IL) et les interférons (IFN).

Ce processus de maturation comprend des changements de morphologies (apparition de dendrites), du cytosquelette, de motilité, la perte de la capacité de l'endocytose (ou de phagocytose), la surexpression des molécules du CMH, des molécules de co-stimulation et d'adhérence ainsi que la capacité à sécréter des cytokines qui influencent les effecteurs immunitaires. Durant la maturation, les DCs expriment également des récepteurs liant des chimiokines (appartenant à la famille des cytokines) qui orientent leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) où résident les lymphocytes.

Ainsi, les DCs sont spécialisées dans la capture, le transport, l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Grâce à cela et grâce à leur capacité à libérer des cytokines (notamment l'IL-12), elles peuvent influencer l'activation de cellules du système inné telles que les cellules NK et les macrophages. Elles peuvent également activer les lymphocytes T et intervenir dans la stimulation des lymphocytes B entraînant la synthèse d'anticorps spécifiques de l'antigène reconnu au préalable (Figure 1.7).

Les DCs sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.⁴³ Depuis plusieurs décennies, elles sont considérées comme les médiateurs essentiels de l'immunité et certaines études montrent qu'elles sont impliquées dans des phénomènes de tolérance afin d'empêcher par exemple le développement de maladies auto-immunes. Leur importance a, par ailleurs, été mise en exergue par les travaux réalisés par Ralph M. Steinman depuis 1973, grâce auxquels il a obtenu le prix Nobel de Médecine en 2011.

⁴¹ Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* **2001**, 2, 675-680.

⁴² Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **2001**, 1, 135-145.

⁴³ Banchereau, J.; Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **1998**, 392, 245-252.

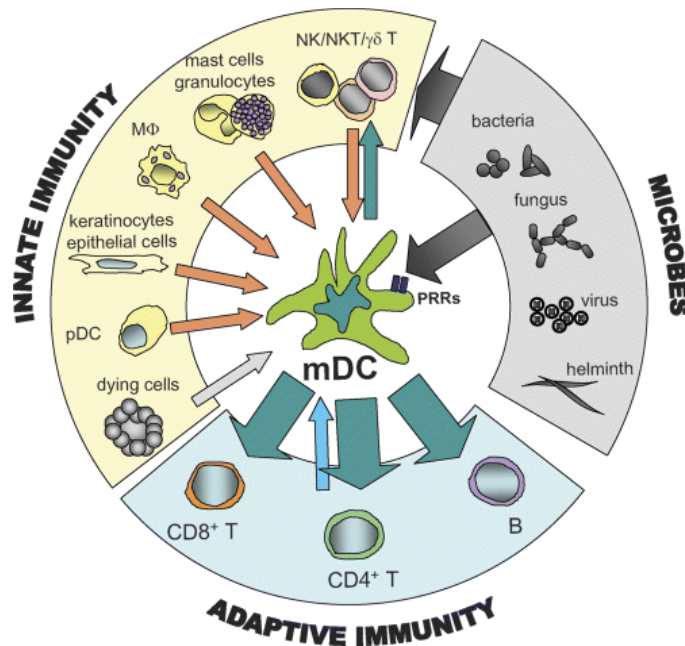


Figure 1.7: Rôle central des DCs au sein du système immunitaire. D'après Ueno et al.⁴⁴

Les DCs peuvent induire une réponse immunitaire robuste, utile dans la défense anti-infectieuse mais aussi anti-tumorale. Cibler les DCs pour concevoir des vaccins⁴⁵ lors d'une approche en immunothérapie anti-cancéreuse^{37, 46} s'avère donc incontournable. De plus la maîtrise de la maturation de ces cellules représente également une étape clé dans le succès de ces approches.⁴⁷

2. Le système immunitaire adaptatif

a. Présentation

L'immunité adaptative (ou immunité acquise) est dépendante de l'immunité innée et débute quelques jours après. Elle constitue une seconde ligne de défense qui permet de neutraliser les antigènes qui ont échappé à la réponse innée. L'immunité acquise définit quatre propriétés caractéristiques qui sont : la spécificité antigénique, la diversité, la mémoire immunitaire et la reconnaissance du Soi et du non Soi. Elle fait intervenir des populations de lymphocytes B et T :

⁴⁴ Ueno, H.; Klechevsky, E.; Morita, R.; Aspor, C.; Cao, T.; Matsui, T.; Di Pucchio, T.; Connolly, J.; Fay, J. W.; Pascual, V.; Palucka, A. K.; Banchereau, J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews* **2007**, *219*, 118-142.

⁴⁵ Steinman, R. M. Dendritic Cells In Vivo: A Key Target for a New Vaccine Science. *Immunity* **2008**, *29*, 319-324.

⁴⁶ Avignan, D. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *Blood Reviews* **1999**, *13*, 51-64.

⁴⁷ Steinman, R. M.; Pope, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *The Journal of Clinical Investigation* **2002**, *109*, 1519-1526.

- *Les lymphocytes B*: ils arrivent à maturation au sein de la moelle osseuse. Lorsqu'ils quittent cette dernière, chacun exprime sur sa membrane un récepteur de liaison à l'antigène spécifique. Le récepteur des cellules B (BCR, de *B-cell Receptor*) est constitué principalement d'une molécule d'anticorps membranaire qui ne reconnaît qu'un seul antigène donné (Figure 1.8a).
- *Les lymphocytes T*: ils effectuent leur maturation dans le thymus. Au cours de leur maturation, les cellules T expriment sur leur membrane une molécule susceptible de se fixer spécifiquement à un antigène donné, nommée récepteur des cellules T (TCR, de *T-cell Receptor*). Contrairement aux anticorps membranaires des cellules B, les TCRs ne peuvent reconnaître un antigène que lorsqu'il est associé aux protéines membranaires du CMH. Il existe deux sous-populations bien définies de cellules T:
 1. Les cellules T auxiliaires (T_H , de *Helper*) qui définissent à leur surface des glycoprotéines membranaires CD_4 . Ces cellules sont restreintes à la reconnaissance d'un antigène lié à une molécule de classe II du CMH. On les appelle aussi cellules $T\ CD_4^+$ (Figure 1.8b).
 2. Les cellules T cytotoxiques (T_C , de *cytotoxic*) qui présentent à leur surface des glycoprotéines membranaires CD_8 . Ces cellules sont restreintes à la reconnaissance d'un antigène lié à une molécule de classe I du CMH. On les appelle également cellules $T\ CD_8^+$ (Figure 1.8c).

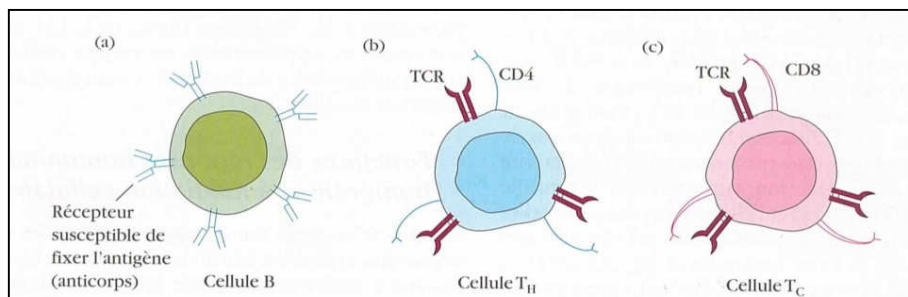


Figure 1.8: Les différents types de lymphocytes du système adaptatif.

D'après Goldsby et al.⁴⁸

Lorsqu'elles quittent leur site de maturation, les cellules B et T naïves migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Au niveau de ces organes, la coopération entre ces lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène et notamment les cellules dendritiques, est

⁴⁸ Goldsby, R. A.; Kindt, T. J.; Osborne, B. A. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby* 2001, Edition Dunod, 660 p.

nécessaire dans le but d'élaborer deux réponses immunitaires distinctes: la réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire.

b. Les réponses immunitaires humorale et à médiation cellulaire

Ces réponses requièrent l'activation au préalable des cellules T_H naïves (Figure 1.9a). Dans un premier temps, les DCs internalisent l'antigène exogène et le dégradent en petits peptides qui sont associés à des molécules de classe II du CMH. Les complexes peptide-molécule de classe II du CMH sont présentés à la surface des DCs. On appelle ces étapes « apprêtement » et « présentation » des antigènes. Le processus d'activation des cellules T_H est initié lorsque leurs récepteurs TCRs reconnaissent spécifiquement le complexe antigène-molécule de classe II du CMH et s'y lient. Cependant, cette interaction, par elle-même, n'est pas suffisante pour activer complètement les cellules T_H naïves. Pour ce faire, il est nécessaire qu'un signal de co-stimulation soit généré grâce à l'interaction entre les molécules membranaires CD28 des cellules T_H et les membres de la famille B7 (B7-1 et B7-2) des DCs. Ensuite, la sécrétion de la cytokine IL-2 amène les cellules T_H activées à proliférer et à se différencier en cellules T_H à mémoire ainsi qu'en cellules T_H effectrices. Ces dernières, spécifiques de l'antigène reconnu, permettent la création des réponses humorale et à médiation cellulaire:

- *Réponse immunitaire humorale (Figure 1.9b):* L'interaction d'une cellule B naïve avec l'antigène par l'intermédiaire de son récepteur BCR déclenche un premier signal de stimulation. Après apprêtement de l'antigène, la cellule B présente à sa surface les peptides qui en résultent, associés à des molécules de classe II du CMH. Une cellule T_H activée qui reconnaît spécifiquement le complexe antigène-molécule de classe II du CMH présenté, se lie à ce dernier, ce qui est à l'origine d'un second signal de stimulation. Par la suite, la production de l'IL-2 par la cellule T_H amène progressivement la cellule B à proliférer et à se différencier en cellules B à mémoire et en plasmocytes sécrétant des anticorps spécifiques de l'antigène. De plus, les anticorps obtenus présentent également une forte affinité pour l'antigène (maturation de l'affinité) et résultent d'un phénomène de commutation de classe aboutissant à des anticorps différents des IgM. Il est ainsi possible de générer des IgG ayant une plus longue durée de vie dans l'organisme. Cette activation est effectuée suivant la voie thymo-dépendante (implication des cellules T_H). Il existe aussi une voie thymo-indépendante. Néanmoins, celle-ci n'aboutit ni à la formation de cellules à mémoire ni à la sécrétion d'anticorps de hautes affinités (libération majoritaire des IgM).

- **Réponse immunitaire à médiation cellulaire (Figure 1.9c):** Les cellules T_C naïves sont activées suivant plusieurs signaux successifs. Le premier est obtenu suite à la reconnaissance du complexe antigène peptidique-molécule de classe I du CMH (au niveau d'une APC ou d'une autre cellule nucléée). Un signal de co-stimulation est ensuite transmis (interaction CD28-B7). L'IL-2 produite, conduit à la prolifération et la différenciation des cellules T_C activées en cellules T_C à mémoire ainsi qu'en lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Au final, les CTLs participent aux réactions immunitaires à médiation cellulaire en tuant les cellules du Soi altérées: ils jouent un rôle important dans la lyse des cellules infectées par un virus et des cellules tumorales qui présentent le complexe antigène peptidique-molécule de classe I du CMH.

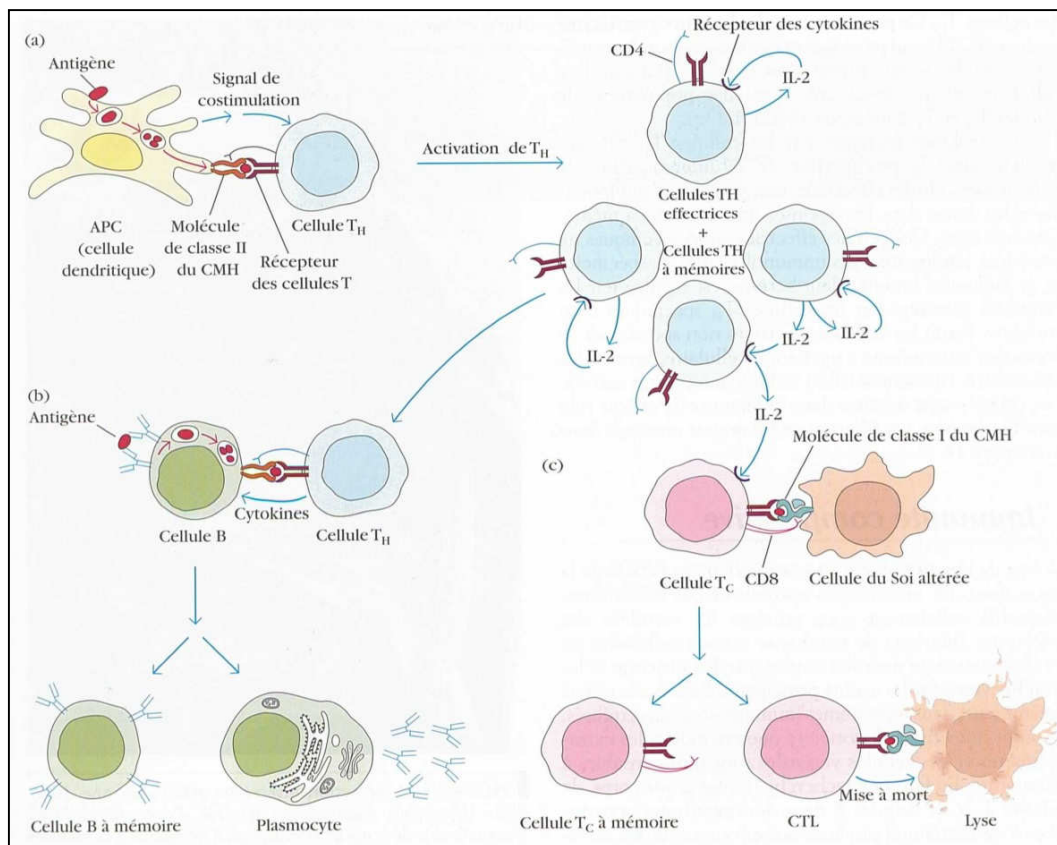


Figure 1.9: Mécanisme des réponses immunitaires. a) Activation des cellules T_H ; b) Réponse humorale; c) Réponse à médiation cellulaire. D'après Goldsby et al.⁴⁸

Les antigènes sont donc capables d'induire des réponses immunitaires spécifiques. Cependant, il convient de différencier deux termes ayant des propriétés bien distinctes que sont l'immunogénicité et l'antigénicité. L'immunogénicité est la capacité d'une substance à induire une réponse immunitaire humorale et/ou à médiation cellulaire. L'antigénicité caractérise la capacité d'une substance à se combiner de manière spécifique avec les produits finaux des réponses

immunitaires (humorale et/ou à médiation cellulaire) tels que les anticorps et/ou les récepteurs TCRs. De ce fait, bien que toutes les molécules qui possèdent la propriété d'immunogénicité aient aussi la propriété d'antigénicité, l'inverse n'est pas vrai.

Comme nous avons pu l'observer, une des caractéristiques de l'immunité adaptative est l'établissement d'une réponse mémoire mise en évidence par l'existence de différentes populations de lymphocytes B et T à mémoire. Ces cellules ont des durées de vie plus longues que les lymphocytes dont ils sont issus. La rencontre initiale de ces derniers avec un antigène induit une réponse primaire. Un contact ultérieur avec ce même antigène, active les cellules à mémoire, à l'origine de l'induction d'une réponse secondaire plus rapide, plus intense et qui dure plus longtemps. Afin d'étayer ces dires, nous pouvons voir sur la figure 1.10, que la réponse humorale secondaire nécessite un délai plus court (1 à 2 jours) que la réponse primaire (5 à 7 jours). De plus, les taux d'anticorps sont beaucoup plus élevés et persistent plus longtemps. Ceci est dû au fait que les lymphocytes B à mémoire répondent à l'antigène plus rapidement et sont activés plus facilement. Les mêmes constats peuvent être effectués pour les réponses à médiations cellulaires secondaires. En raison de cette propriété, le système immunitaire peut conférer une immunité qui peut durer de nombreuses années contre une variété d'antigènes. De ce fait, le principe de mémoire immunitaire est à la base de la vaccination.

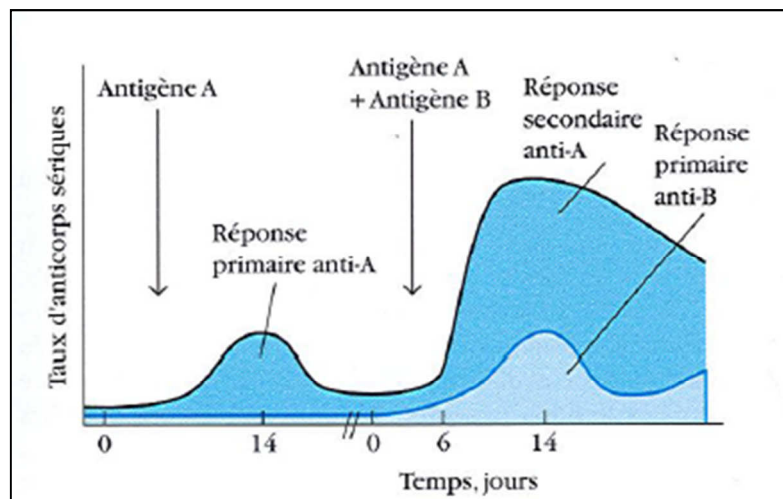


Figure 1.10: Mise en évidence des différences dans les réponses humorales primaires et secondaires.
D'après Kindt et al.¹

3. Les anticorps: effecteurs de l'immunité humorale

a. Caractérisation

Les anticorps sont des glycoprotéines que l'on peut trouver soit sous forme de constituants des récepteurs BCRs des cellules B, soit sous forme de molécules solubles sécrétées par les plasmocytes. Ils font partis de la superfamille des immunoglobulines (Ig). Toutes les molécules d'anticorps ont une structure commune formée de quatre chaînes polypeptidiques: deux chaînes légères L identiques et deux chaînes lourdes H identiques. Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde par une liaison disulfure et par un ensemble d'interactions non covalentes telles que les liaisons salines, les liaisons hydrogènes et les liaisons hydrophobes pour former un hétérodimère H-L. Ces mêmes types de liaisons lient l'un à l'autre deux hétérodimères. Par ailleurs, ces chaînes polypeptidiques sont repliées en domaine contenant une liaison disulfure intrachaîne qui forme une boucle de 60 acides aminés (Figure 1.11).

Les 110 premiers acides aminés de la région amino-terminale d'une chaîne légère ou d'une chaîne lourde varient grandement d'un anticorps à un autre. Ces séquences très variables sont appelées régions V (V_L et V_H). Ce sont ces régions qui sont impliquées dans l'interaction spécifique avec un antigène donné. Le reste de chaque chaîne de la molécule d'immunoglobuline sont des régions présentant des séquences relativement constantes, dénommées régions C (C_L et C_H). Dans le cas des anticorps solubles, les régions constantes des chaînes lourdes sont à l'origine de fonctions effectrices visant à détruire l'antigène reconnu. Il existe différentes classes d'immunoglobulines. On peut citer par exemple, l'immunoglobuline M (IgM) qui représente 5 à 10% des Igs dans le sérum. C'est la première classe d'immunoglobuline à être sécrétée lors d'une réponse primaire. L'immunoglobuline G (IgG) est la classe la plus abondante dans le sérum et représente 80% des Igs totales. De plus, l'IgG présente la demi-vie dans le sérum (*in vivo*) la plus importante de toutes les Igs.

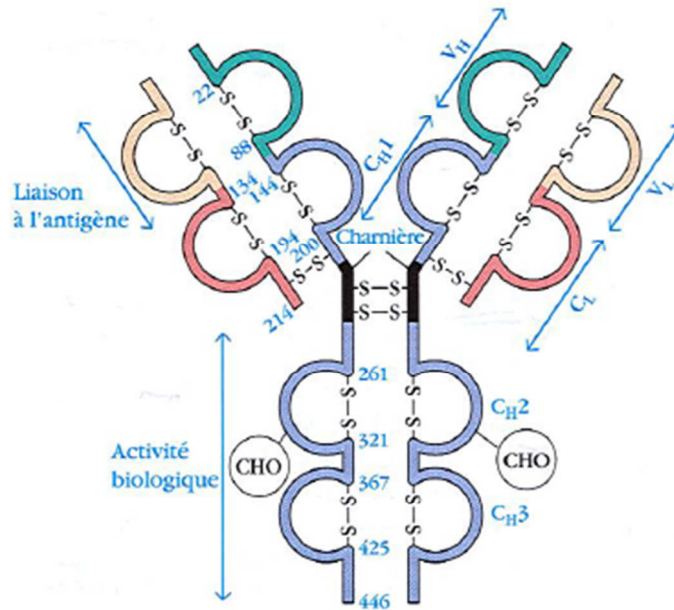


Figure 1.11: Représentation schématique de la structure des immunoglobulines solubles.
D'après Kindt et al.¹

b. Reconnaissance de l'antigène - Notion d'épitope

Les antigènes peuvent être des molécules complexes et volumineuses. Ainsi, les anticorps solubles ou présents à la surface des lymphocytes B, de même que les récepteurs TCRs des lymphocytes T, n'en reconnaissent qu'une partie. Ces sites particuliers, appelés déterminants antigéniques ou épitopes, sont des régions immunologiquement actives de l'antigène. Comme évoqué précédemment, les cellules B détectent les épitopes seuls alors que les cellules T ne reconnaissent les épitopes que lorsqu'ils sont associés à une molécule classe II du CMH. De plus, du fait de leur complexité structurale, les antigènes peuvent contenir différents déterminants antigéniques. Le système immunitaire répond alors par la production d'anticorps spécifiques de certains de ces épitopes impliquant la participation de plusieurs clones de cellules B. Ces cellules sécrètent des anticorps dits monoclonaux qui se lient spécifiquement à un seul déterminant antigénique. La réponse anticorps polyclonale à un antigène est constituée de l'ensemble de ces anticorps monoclonaux. Ces derniers présentent, par ailleurs, de nombreuses applications dans le domaine du diagnostic et de la thérapeutique.

c. Fonctions effectrices médiées par les anticorps

Après s'être liées à l'antigène, les régions constantes C_H des anticorps sont responsables de toute une série d'interactions synergiques avec d'autres protéines sériques ou certains récepteurs

membranaires dont résultent les fonctions effectrices de la réponse humorale. Plusieurs fonctions effectrices ont pu être répertoriées (Figure 1.12). Dans le cas d'un antigène présent à la surface des cellules cancéreuses (par exemple, les TACAs), on peut citer l'activation du système du complément. Celui-ci entraîne la perforation des membranes cellulaires (CDC: *Complement-Dependent Cytotoxicity*). Un autre type de lyse membranaire est appelé cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC: *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*). Dans ce processus, l'anticorps interagit avec les récepteurs Fc de certaines cellules comme les macrophages et les NK, qui peuvent ainsi provoquer la lyse des cellules cancéreuses.

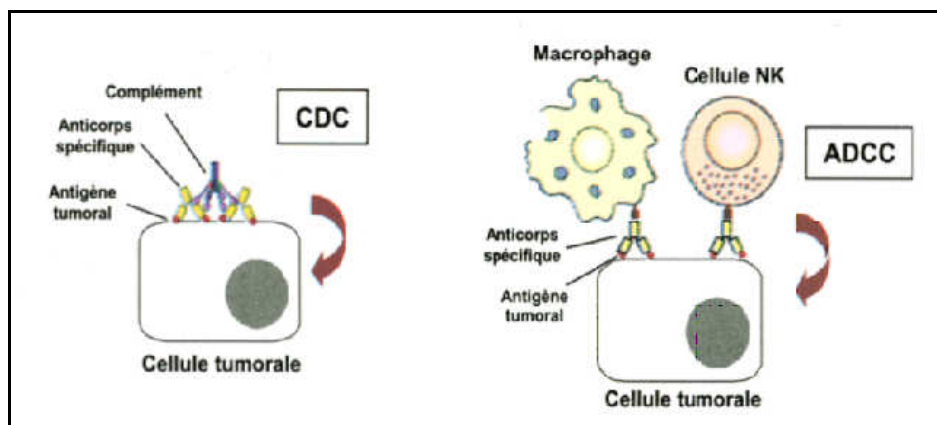


Figure 1.12: Exemples de fonctions effectrices induites par les anticorps. D'après Bay et al.⁴⁹

C. Vaccination anti-tumorale

La majeure partie des traitements habituellement utilisés contre le cancer tels que la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie présentent encore de nos jours de nombreux inconvénients du fait de leur toxicité, de leur manque de sélectivité et de leur incapacité à neutraliser totalement l'ensemble des métastases chez un patient. Les scientifiques se sont alors tournés vers l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

En parallèle, certains chercheurs ont constaté que la réponse du système immunitaire vis-à-vis d'une tumeur était, en général, inefficace pour empêcher son développement. Les patients cancéreux présentent, en effet, un système immunitaire plus affaibli en comparaison avec la population saine. De plus, les tumeurs sont capables d'éviter la détection immunitaire grâce à différents mécanismes immuno-suppresseurs.

⁴⁹ Bay, S.; Freire, T. Immunothérapie anti-tumorale ciblée sur des antigènes osidiques. *Revue Francophone des Laboratoires* **2006**, 381, 39-46.

La compréhension des mécanismes moléculaires et des phénomènes engendrés par les systèmes inné et adaptatif a ainsi stimulé le développement intense, ces dernières années, de nombreuses approches d'immunothérapies anti-cancéreuses en association avec les thérapies usuelles évoquées ci-dessus. L'objectif étant d'induire ou de renforcer l'immunité existante afin de mieux détecter les cellules cancéreuses et de les détruire sélectivement.

L'immunothérapie anti-cancéreuse est caractérisée par des stratégies "passives" ou "actives". L'immunisation passive consiste à introduire des molécules (cytokines, anticorps monoclonaux,⁵⁰ ...) pour éliminer les cellules cancéreuses. Certains traitements de ce type ont fait leur preuve comme l'interleukine 2 (IL-2, Proleukine[®]) et l'interféron α (IFN- α , Intron[®] A, Roféron[®]-A) employés contre le cancer du rein métastatique.⁵¹ Le trastuzumab (Herceptin[®]) est un anticorps monoclonal actuellement utilisé pour traiter le cancer du sein.⁵² Néanmoins, l'immunisation passive n'active pas le système immunitaire et ne crée pas de réponses mémoires. La protection apportée est alors transitoire.

L'immunisation active, quant à elle, implique l'administration de composés vaccinaux qui induisent une réponse humorale et/ou cellulaire spécifique avec une mémoire immunitaire. Certaines stratégies reposent sur l'administration directe de cellules tumorales lysées ou inactivées par irradiation. On peut citer par exemple, la Melacine[®] (Corixa Corporation), utilisée pour le traitement du mélanome. Cette technologie a été affinée en modifiant génétiquement les cellules tumorales, autologues (appartenant au patient) ou allogéniques (venant d'une autre personne), afin qu'elles produisent des cytokines ou des molécules co-stimulatrices⁵³ nécessaires à l'activation des lymphocytes T. Néanmoins, les inconvénients de ces méthodes incluent un travail intensif, un coût important du personnel médical ainsi que certaines difficultés à mesurer des réponses immunitaires spécifiques.

Comme nous l'avons défini précédemment, certaines stratégies plus spécifiques emploient directement les cellules dendritiques pour élaborer un vaccin.^{37,54} Par exemple, ces cellules peuvent être générées *ex vivo* à partir de cellules souches du patient, chargées avec un antigène

⁵⁰ Scott, A. M.; Welt, S. Antibody-based immunological therapies. *Current Opinion in Immunology* **1997**, 9, 717-722.

⁵¹ Bay, J-O.; Penault-Llorca, F.; Ravaud, A.; Chevreau, C.; Négrier, S.; Escudier, B. New entities in pathological classification and new therapeutic options in renal cell carcinoma. *Bulletin du Cancer* **2006**, 93, 91-100.

⁵² Adams, G. P.; Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology* **2005**, 23, 1147-1157.

⁵³ Allison, J. P.; Hurwitz, A. A.; Leach, D. R. Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Current Opinion in Immunology* **1995**, 7, 682-686.

⁵⁴ Banchereau, J.; Palucka, A. K. Dendritic Cells as Therapeutic Vaccines Against Cancer. *Nature Reviews Immunology* **2005**, 5, 296-306.

puis réinjectées au patient dans le but d'activer les agents du système immunitaire et d'éliminer les cellules tumorales. Cette méthode a permis la création du Sipuleucel-T (Provenge[®], Dendreon) qui est le premier vaccin thérapeutique, pour le traitement du cancer de la prostate métastatique, dont la mise sur le marché a été approuvée par la FDA en 2010. Malgré tout, il est important de signaler que les procédés d'obtention de ce type de vaccin sont lourds et présentent des risques en terme de qualité vaccinale (contaminations).

De nombreux groupes ont, en parallèle, conçu des vaccins issus de synthèses organiques. Parmi eux, nous pouvons citer les vaccins de type peptidique. Ainsi, l'équipe de A. Delmas, a synthétisé des mimes de la mucine MUC1 (Figure 1.13) comprenant deux unités répétitives de MUC1 orientées en sens inverse et conjuguées à un épitope peptidique universel des cellules T_H (PADRE).⁵⁵ Des études pré-cliniques (chez la souris), ont mis en évidence que cette structure stimulait la production d'anticorps capables de reconnaître la protéine recombinante MUC1 non glycosylée.

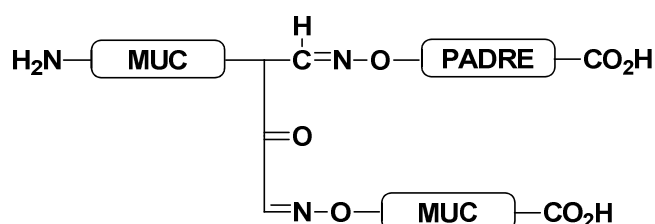


Figure 1.13: Vaccin peptidique développé.

Depuis l'identification des antigènes saccharidiques associés aux tumeurs (TACAs), d'autres groupes se sont affairés à mettre en place des candidats vaccins présentant ces structures. L'intérêt étant d'obtenir des réponses immunitaires robustes envers les cellules qui expriment les TACAs.^{21,49,56} Néanmoins, l'élaboration de vaccins cliniquement viables à base de TACAs est associée à certaines contraintes.

1. Contraintes associées au développement de vaccins à base de TACAs

Dans un premier temps, le domaine saccharidique du candidat vaccin doit être pur, disponible en quantités suffisantes et structuralement défini. De façon général, l'obtention de

⁵⁵ Cremer, G-A.; Bureau, N.; Lelièvre, D.; Piller, V.; Piller, F.; Delmas, A. Synthesis of Branched Oxime-Linked Peptide Mimetics of the MUC1 Containing a Universal T-Helper Epitope. *Chemistry - A European Journal* **2004**, *10*, 6353-6360.

⁵⁶ Buskas, T.; Thompson, P.; Boons, G-J. Immunotherapy for cancer: synthetic carbohydrate-based vaccines. *Chemical Communications* **2009**, *36*, 5335-5349.

molécules glycosylées à partir de sources biologiques naturelles est un travail complexe qui conduit le plus souvent à des mélanges hétérogènes et à de faibles quantités de produits. Les synthèses organiques *de novo* représentent des solutions viables et peuvent aboutir à la formation d'antigènes saccharidiques homogènes, de grandes puretés et dans des quantités relativement élevées.

Par ailleurs, il est important de comprendre que l'induction d'une réponse immunitaire envers les TACAs n'est pas toujours simple à mettre en place. En effet, la plupart des antigènes saccharidiques sont strictement des épitopes des cellules B et en l'absence de médiateurs externes, entraînent une réponse humorale de faible intensité, indépendante des cellules T_H (voie thymo-indépendante; Figure 1.14a). En général, ces antigènes ne peuvent activer, par eux-mêmes, les cellules T_H puisqu'ils ne sont pas présentés sur les membranes des APCs. Après interaction avec les antigènes saccharidiques, les cellules B sont partiellement activées. Elles se différencient en plasmocytes qui produisent seulement des anticorps IgM de courtes durées de vie et de faibles affinités pour l'antigène. Il n'y a pas non plus de formation de cellules à mémoire. Cependant, pour qu'une approche en immunothérapie anti-tumorale soit efficace, les réponses immunitaires doivent être intenses doublées d'une mémoire immunitaire caractéristiques d'une immunisation active. Ceci nécessite une activation complète des cellules B qui est seulement obtenue grâce à l'intervention des cellules T_H (voie thymo-dépendante; Figure 1.14b). L'initiation de cette voie aboutit à la libération d'IgG de haute affinité (maturation de l'affinité+commutation de classe) et la formation de cellules B à mémoire.

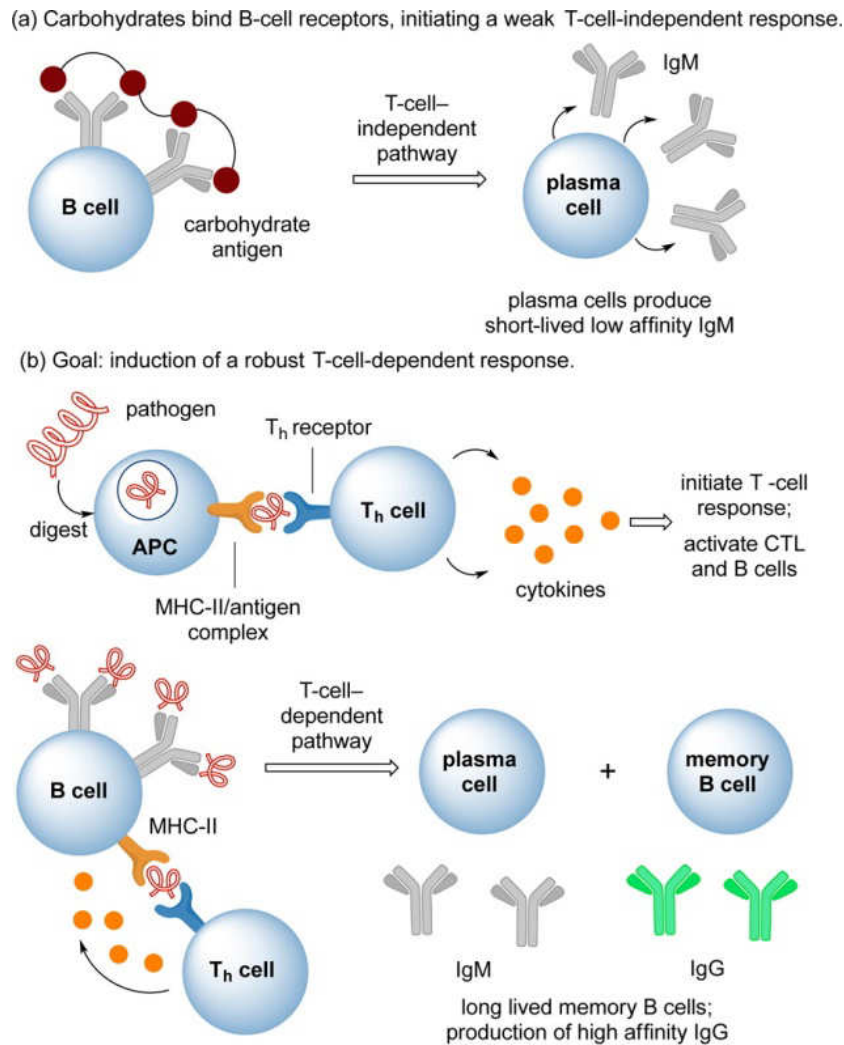


Figure 1.14: Intensité des réponses immunitaires envers les TACAs: rôle primordial des cellules T_H .
D'après Danishefsky et al.²¹

De plus, de nombreux TACAs sont également exprimés, en faible quantité, sur certaines cellules saines. Ces TACAs sont assimilés à des "self-antigen" qui sont tolérés par le système immunitaire. Leur immunogénicité est donc faible. L'induction d'une réponse immunitaire efficace, dépendante des cellules T_H tout en brisant l'immuno-tolérance acquise par ces TACAs, nécessite l'installation d'éléments immuno-stimulants sur la structure vaccinale. Cette stratégie permet une meilleure présentation des TACAs au système immunitaire.

Enfin, pour mimer la microhétérogénéité antigénique rencontrée à la surface des cellules tumorales, il est parfois nécessaire d'incorporer plusieurs TACAs différents au sein d'une même structure vaccinale. Ces antigènes doivent être reliés à un même type de cancer.

Dans cette partie, nous mettrons en exergue l'ensemble des efforts fournis pour le développement de candidats vaccins à base d'antigènes saccharidiques associés aux tumeurs ainsi

que les résultats des tests pré-cliniques (chez la souris) et cliniques (chez l'Homme) qui en découlent.

2. Vaccins à base de TACAs conjugués à une protéine porteuse

La majorité des travaux réalisés sur le développement de vaccins anti-tumoraux à base de TACAs est due au succès rencontré par les vaccins glycoconjugués anti-bactériens, dont certains ont été commercialisés. Ils impliquent la conjugaison d'antigènes saccharidiques à une protéine porteuse immunogène telle que la protéine KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) ou BSA (*Bovin Serum Albumin*).⁵⁷ Ces protéines incorporent des séquences peptidiques, épitopes des cellules T_H qui peuvent être présentées à la surface des APCs sous forme de complexe avec des molécules de classe II du CMH. De ce fait, les protéines porteuses peuvent activer les cellules T_H et induire la formation d'IgG de hautes affinités. De manière générale, ces vaccins conjugués sont co-administrés avec un immuno-adjuvant comme QS-21 (de type saponine), GPI-0100, Detox ou BCG (Bacille de Calmette-Guérin) afin d'exacerber la réponse immunitaire globale dirigée contre les TACAs, en stimulant le système inné. Dans cette stratégie, la conception de la molécule vaccinale est importante pour obtenir une réponse anti-tumorale robuste. L'efficacité du candidat vaccin dépend de la structure de la protéine porteuse, de la nature du linker, du type d'adjuvant, du mode de conjugaison chimique, de la nature, du nombre et de la densité du ou des TACAs présents sur une protéine porteuse. Plusieurs travaux préliminaires ont démontré l'importance de ces facteurs. Notamment, Helling et ses collaborateurs ont démontré que parmi l'ensemble des méthodes de conjugaison, des protéines porteuses et des adjuvants étudiés, l'attachement covalent par amination réductrice de l'antigène saccharidique GD3, isolé au préalable, à KLH et l'utilisation de QS-21 permettait de générer une réponse immunitaire optimale.⁵⁸

a. Vaccins conjugués monomériques

Les candidats vaccins à base de TACAs monomériques sont définis par la présence d'un seul type d'antigène saccharidique liée à une protéine porteuse. Le laboratoire de S. J. Danishefsky a beaucoup œuvré dans ce domaine. Leur programme débuta par la synthèse de

⁵⁷ Slovin, S. F.; Keding, S. J.; Ragupathi, G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunology and Cell Biology* **2005**, 83, 418-428.

⁵⁸ Helling, F.; Shang, A.; Calves, M.; Zhang, S.; Ren, S.; Yu, R. K.; Oettgen, H. F.; Livingston, P. O. GD₃ Vaccines for Melanoma: Superior Immunogenicity of Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccines. *Cancer Research* **1994**, 54, 197-203.

l'unité saccharidique Le^y, fonctionnalisée par un groupement allyle. Après ozonolyse et formation de l'aldéhyde résultant, le domaine saccharidique Le^y a été conjugué directement à KLH par amination réductrice. Les souris immunisées avec Le^y-KLH (Figure 1.15), co-administré avec QS-21 ont généré majoritairement des anticorps de type IgM ainsi qu'une faible quantité d'IgG.⁵⁹ Ces anticorps ont montré qu'ils reconnaissent fortement et sélectivement les lignées cellulaires cancéreuses humaines MCF-7 qui expriment Le^y à leur surface. Ces anticorps, très réactifs vis-à-vis de ces cellules, ont entraîné leur destruction médiée par le complément (CDC). Des tests cliniques en phase I pour le traitement du cancer des ovaires ont par la suite été effectués.⁶⁰ Malheureusement, la plupart des anticorps détectés, de type IgM, présentaient de faibles affinités pour l'antigène cible. Le candidat vaccin n'a donc pas été conduit en phase II.

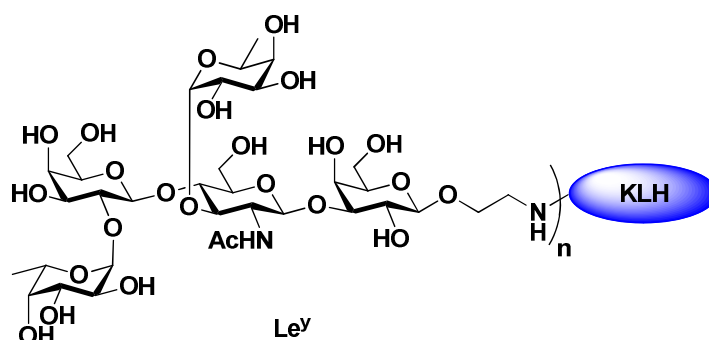


Figure 1.15: Vaccin glycoconjugué monomérique Le^y-KLH.

La même équipe s'est également tournée vers l'élaboration du candidat vaccin Globo-H-KLH, injecté en présence de QS-21. En plus de l'amination réductrice directe décrite ci-dessus, une autre méthode de conjugaison à KLH du domaine saccharidique Globo-H fonctionnalisé par un groupement allyle, a été effectuée en utilisant un linker bifonctionnel, le MMCCH (4-(4-*N*-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carbonylhydrazide; Figure 1.16). Les études pré-cliniques furent encourageantes mettant en évidence de forts taux d'IgM et d'IgG anti-Globo-H.⁶¹ Ces anticorps ont démontré une grande capacité à induire la lyse des cellules cancéreuses. Cette construction a ensuite été testée en phase clinique I chez des patients atteints du cancer de la

⁵⁹ Kudryashov, V.; Kim, H. M.; Ragupathi, G.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Lloyd, K. O. Immunogenicity of synthetic conjugates of Lewis^y oligosaccharide with proteins in mice: towards the design of anticancer vaccines. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **1998**, *45*, 281-286.

⁶⁰ Sabbatini, P. J.; Kudryashov, V.; Ragupathi, G.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Bornmann, W.; Spassova, M.; Zatorski, A.; Spriggs, D.; Aghajanian, C.; Soignet, S.; Peyton, M.; O'Flaherty, C.; Curtin, J.; Lloyd, K. O. Immunization of ovarian cancer patients with a synthetic Lewis^y-protein conjugate vaccine: a phase I trial. *International Journal of Cancer* **2000**, *87*, 79-85.

⁶¹ Ragupathi, G.; Park, T. K.; Zhang, S.; Kim, I. J.; Graber, L.; Adluri, S.; Lloyd, K. O.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Immunization of Mice with a Fully Synthetic Globo-H Antigen Results in Antibodies against Human Cancer Cells: A Combined Chemical-Immunological Approach to the Fashioning of an Anticancer Vaccine. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36*, 125-128.

prostate⁶² et du cancer du sein métastatique.⁶³ Dans les deux cas, le candidat vaccin a été toléré par l'organisme, ne présentait pas de toxicité particulière et les IgM libérés se sont montrés très réactifs à l'encontre des cellules tumorales. Pour le traitement du cancer du sein, ce composé vaccinal est parvenu à la phase II/III.

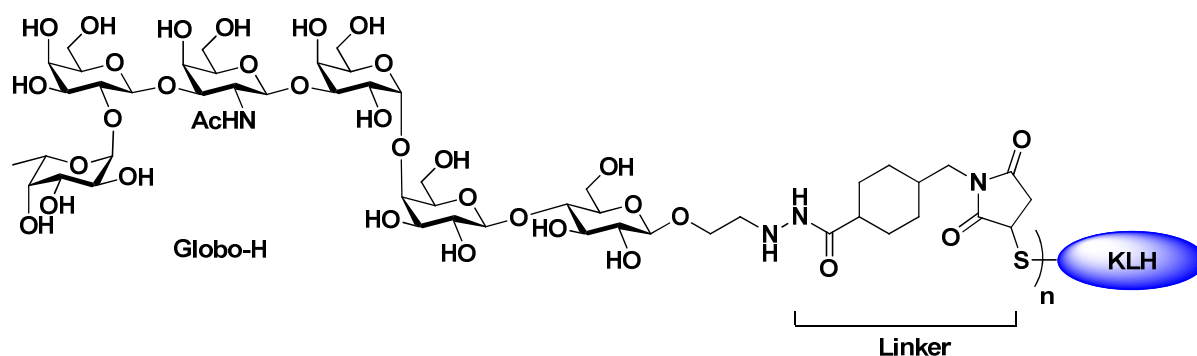


Figure 1.16: Vaccin glycoconjugué monomérique Globo-H-KLH.

Le groupe de G-J. Boons a, de son côté, synthétisé un glycoconjugué comprenant l'antigène KH-1 ($\text{Le}^y\text{-Le}^x$) lié à KLH par l'intermédiaire d'un espaceur artificiel de type aminopropyle. Cet espaceur a été modifié par un groupement thioacétyle pour faciliter la conjugaison avec la protéine porteuse. Le glycoconjugué co-administré avec QS-21 chez la souris induit une réponse immunitaire robuste dépendante des cellules T_H dirigée principalement contre l'antigène KH-1.⁶⁴

Plusieurs autres candidats vaccins monomériques ont été évalués à divers stades (phase I, II et III).^{65,66,67} Parmi ceux qui sont parvenus à la phase de développement clinique III, nous pouvons citer notamment le GM2-KLH (avec QS-21) évalué chez des patients atteints de

⁶² Slovin, S. F.; Ragupathi, G.; Adluri, S.; Ungers, G.; Terry, K.; Kim, S.; Spassova, M.; Bornmann, W.; Fazzari, M.; Dantis, L.; Olkiewicz, K.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J.; Scher, H. I. Carbohydrate vaccines in cancer: Immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 5710-5715.

⁶³ Gilewski, T.; Ragupathi, G.; Bhuta, S.; Williams, L. J.; Musselli, C.; Zhang, X-F.; Bencsath, K. P.; Panageas, K. S.; Chin, J.; Hudis, C. A.; Norton, L.; Houghton, A. N.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: A phase I trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 3270-3275.

⁶⁴ Buskas, T.; Li, Y.; Boons, G-J. Synthesis of a Dimeric Lewis Antigen and the Evaluation of the Epitope Specificity of Antibodies Elicited in Mice. *Chemistry - A European Journal* **2005**, 11, 5457-5467.

⁶⁵ Krug, L. M.; Ragupathi, G.; Hood, C.; Kris, M. G.; Miller, V. A.; Allen, J. R.; Keding, S. J.; Danishefsky, S. J.; Gomez, J.; Tyson, L.; Pizzo, B.; Baez, V.; Livingston, P. O. Vaccination of Patients with Small-Cell Lung Cancer with Synthetic Fucosyl GM-1 Conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin. *Clinical Cancer Research* **2004**, 10, 6094-6100.

⁶⁶ Musselli, C.; Livingston, P. O.; Ragupathi, G. Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **2001**, 127 (suppl 2), R20-R26.

⁶⁷ Miles, D. W.; Towlson, K. E.; Graham, R.; Reddish, M.; Longenecker, B. M.; Taylor-Papadimitriou, J.; Rubens, R. D. A randomised phase II study a sialyl-Tn and DETOX-B adjuvant with or without cyclophosphamide pretreatment for the active specific immunotherapy of breast cancer. *British Journal of Cancer* **1996**, 74, 1292-1296.

mélanome (stade IIB-III). Cependant, celui-ci n'a pas montré de bénéfices pour la survie globale et n'a pas apporté d'avantages thérapeutiques en comparaison avec un traitement à l'interféron α (IFN- α).⁶⁸ Un second candidat, le STn-KLH (Theratope[®], oncothyreon) testé pour le traitement du cancer du sein métastatique n'a pas non plus engendré de bénéfices, hormis pour les patients ayant subi, au préalable, une hormonothérapie.⁶⁹

b. Vaccins présentant des clusters d'antigènes saccharidiques

Le groupe de S. J. Danishefsky a, par la suite, mis en place des constructions plus sophistiquées qui ressemblent plus précisément aux architectures rencontrées, le plus souvent, à la surface des cellules tumorales. De ce fait, il est reconnu que les antigènes saccharidiques Tn, TF, STn exprimés par les mucines sont présentés sur des résidus Sérine (Ser) et Thréonine (Thr) adjacents. Ceci entraîne la formation de clusters contenant plusieurs sucres. Ces glycoclusters sont, de surcroît, des cibles privilégiées pour les anticorps monoclonaux. On peut donc envisager que mimer cet "effet cluster" dans des vaccins synthétiques pourrait améliorer leur immunogénicité. Afin d'induire des anticorps qui ciblent plus efficacement la surface des cellules tumorales, des composés où 3 antigènes identiques Tn, TF ou STn présentés sur 3 résidus Ser ou Thr, ont été synthétisés. Des glycopeptides trimériques Tn(c), TF(c) et STn(c) ont alors été formés (c, pour cluster). Ces glycopeptides ont été conjugués à la protéine KLH par l'intermédiaire du linker bifonctionnel MBS (ester *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinamide). Comme espéré, les évaluations pré-cliniques ont révélé que ces candidats vaccins sous forme de cluster, engendraient la production d'une quantité plus importante d'anticorps que leurs homologues monomériques. Le vaccin Tn(c)-KLH (Figure 1.17), co-administré avec QS-21 fut considéré comme le plus efficace induisant de forts taux d'IgM (majoritaires) et d'IgG qui reconnaissaient spécifiquement les cellules cancéreuses humaines, LS-C, qui expriment sur leur membrane plasmique le cluster Tn(c).⁷⁰

⁶⁸ Kirkwood, J. M.; Ibrahim, J. G.; Sosman, J. A.; Sandak, V. K.; Agarwala, S. S.; Ernstoff, M. S.; Rao, R. High-Dose Interferon Alfa-2b Significantly Prolongs Relapse-Free and Overall Survival Compared With the GM2-KLH/QS-21 Vaccine in Patients With Resected Stage IIB-III Melanoma: Results of Intergroup Trial E1694/S9512/C509801. *Journal of Clinical Oncology* **2001**, *19*, 2370-2380.

⁶⁹ Holmberg, L. A.; Sandmaier, B. M. Vaccination with Theratope[®] (STn-KLH) as treatment for breast cancer. *Expert Reviews of Vaccines* **2004**, *3*, 655-663.

⁷⁰ Kuduk, S. D.; Schwarz, J. B.; Chen, X-T.; Glunz, P. W.; Sames, D.; Ragupathi, G.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. Synthetic and Immunological Studies on Clustered Modes of Mucin-Related Tn and TF O-Linked Antigens: The Preparation of a Glycopeptide-Based Vaccine for Clinical Trials against Prostate Cancer. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 12474-12485.

Cette structure vaccinale ainsi que TF(c)-KLH ont pu être testés en phase clinique I, chez des patients atteints du cancer de la prostate.^{71,72}

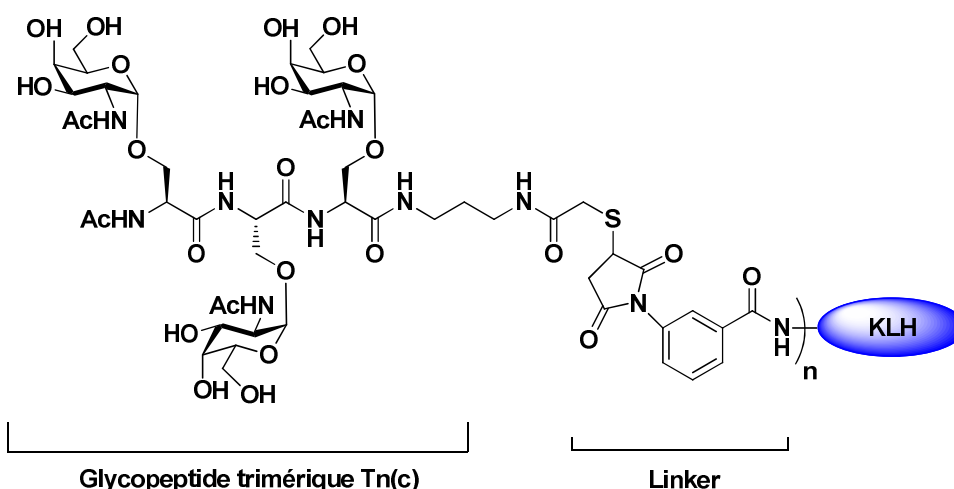


Figure 1.17: Vaccin de type glycocluster trimérique Tn conjugué à KLH.

On peut également citer d'autres études portant sur l'élaboration de structures basées sur l'utilisation de glycopeptides dérivés de MUC1.⁷³ Ces glycopeptides présentent différentes copies de l'antigène Tn et sont conjuguées à KLH. Il a par ailleurs été démontré que ce type de construction pouvait induire une plus forte réponse anticorps anti-Tn par rapport au composé Tn(c)-KLH.⁷⁴

c. Vaccins multi-antigéniques

Malgré leurs bons résultats obtenus en tests pré-cliniques et cliniques, les vaccins décrits précédemment ne permettent pas de mimer la microhétérogénéité rencontrée à la surface des cellules tumorales. Pour ce faire, S. J. Danishefsky et P. Livingston ont, dans un premier temps, mis en place un mélange de 7 glycoconjugués différents TACA-KLH, injectés ensemble

⁷¹ Slovin, S. F.; Ragupathi, G.; Musselli, C.; Olkiewicz, K.; Verbel, D.; Kuduk, S. D.; Schwarz, J. B.; Sames, D.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Scher, H. I. Fully Synthetic Carbohydrate-Based Vaccines in Biochemically Relapsed Prostate Cancer: Clinical Trial Results With α -N-Acetylgalactosamine-O-Serine/Threonine Conjugate Vaccine. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, *21*, 4292-4298.

⁷² Slovin, S. F.; Ragupathi, G.; Musselli, C.; Fernandez, C.; Diani, M.; Verbel, D.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Scher, H. I. Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS-21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2005**, *54*, 694-702.

⁷³ Sørensen, A. L.; Reis, C. A.; Tarp, M. A.; Mandel, U.; Ramachandran, K.; Sankaranarayanan, K.; Schwientek, T.; Graham, R.; Taylor-Papadimitriou, J.; Hollingsworth, M. A.; Burchell, J.; Clausen, H. Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. *Glycobiology* **2006**, *16*, 96-107.

⁷⁴ Kagan, E.; Ragupathi, G.; Yi, S. S.; Reis, C. A.; Gildersleeve, J.; Kahne, D.; Clausen, H.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2005**, *54*, 424-430.

simultanément dans le but d'induire une réponse immunitaire importante dirigée contre chaque TACA présent (Figure 1.18). Les structures antigéniques saccharidiques choisies sont: GM2, Le^y, Globo-H, STn(c), TF(c), Tn(c) et un peptide MUC1 présentant plusieurs Tn. D'après les résultats, les souris immunisées avec ce mélange en présence de GPI-0100, ont généré des anticorps dirigés contre l'ensemble des épitopes introduits hormis GM2.⁷⁵

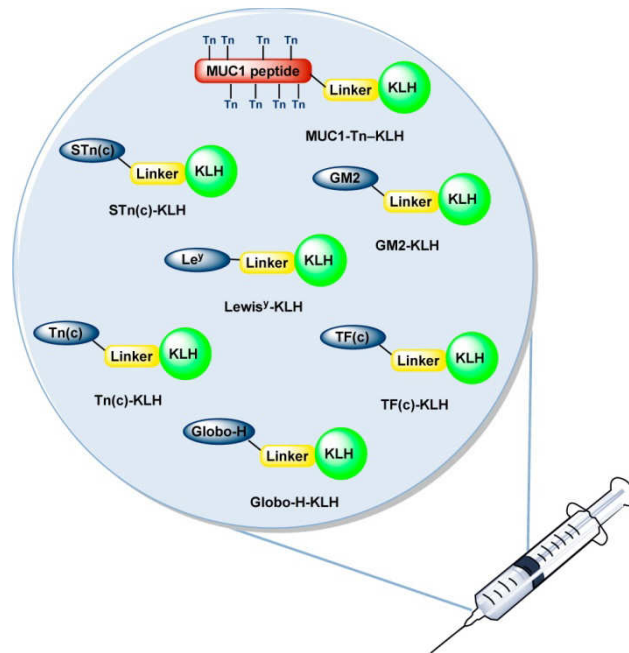


Figure 1.18 Vaccin basé sur le mélange de sept glycoconjugués différents.

Cette stratégie vaccinale a été ensuite étudiée en phase de développement clinique I. Cette mixture, co-administrée avec QS-21, a engendré la production d'anticorps principalement de type IgM.⁷⁶ Néanmoins, le taux d'anticorps mesuré fut significativement plus faible que ceux obtenus lors de l'administration séparée de chaque glycoconjugué TACA-KLH. Ceci peut être attribué à la quantité importante injectée en protéine porteuse immunogène KLH qui pourrait ainsi entraîner une diminution des réponses immunitaires envers chaque antigène saccharidique.

Une autre approche a alors été envisagée. Elle a impliqué le développement de candidats vaccins multi-antigéniques unimoléculaires. Dans cette approche, plusieurs dérivés TACAs

⁷⁵ Ragupathi, G.; Koide, F.; Sathyan, N.; Kagan, E.; Spassova, M.; Bornmann, W.; Gregor, P.; Reis, C. A.; Clausen, H.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. A preclinical study comparing approaches for augmenting the immunogenicity of a heptavalent KLH-conjugate vaccine against epithelial cancers. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2003**, 52, 608-616.

⁷⁶ Sabbatini, P. J.; Ragupathi, G.; Hood, C.; Aghajanian, C. A.; Juretzka, M.; Iasonos, A.; Hensley, M. L.; Spassova, M. K.; Ouerfelli, O.; Spriggs, D. R.; Tew, W. P.; Konner, J.; Clausen, H.; Rustum, N. A.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Pilot Study of a Heptavalent Vaccine-Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate plus QS-21 in Patients with Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, or Peritoneal Cancer. *Clinical Cancer Research* **2007**, 13, 4170-4177.

synthétiques ont été associés sur un même squelette peptidique et l'ensemble a été conjugué à KLH. Ces TACAs sont en général reliés à un même type de cancer. Ce type de construction permet de respecter le concept de microhétérogénéité et permet une réduction de la quantité en protéine immunogène. Une première construction trivalente comprenant les antigènes Tn, Le^y et Globo-H a été synthétisée (Figure 1.19).⁷⁷ Ces antigènes sont tous exprimés par les cellules cancéreuses de la prostate. Cette structure associée à GPI-0100, a été inoculée chez la souris. Les résultats ont révélé la détection d'anticorps reconnaissant les 3 TACAs. Ces derniers ont également présenté une importante réactivité vis-à-vis des cellules cancéreuses humaines MCF-7.⁷⁸

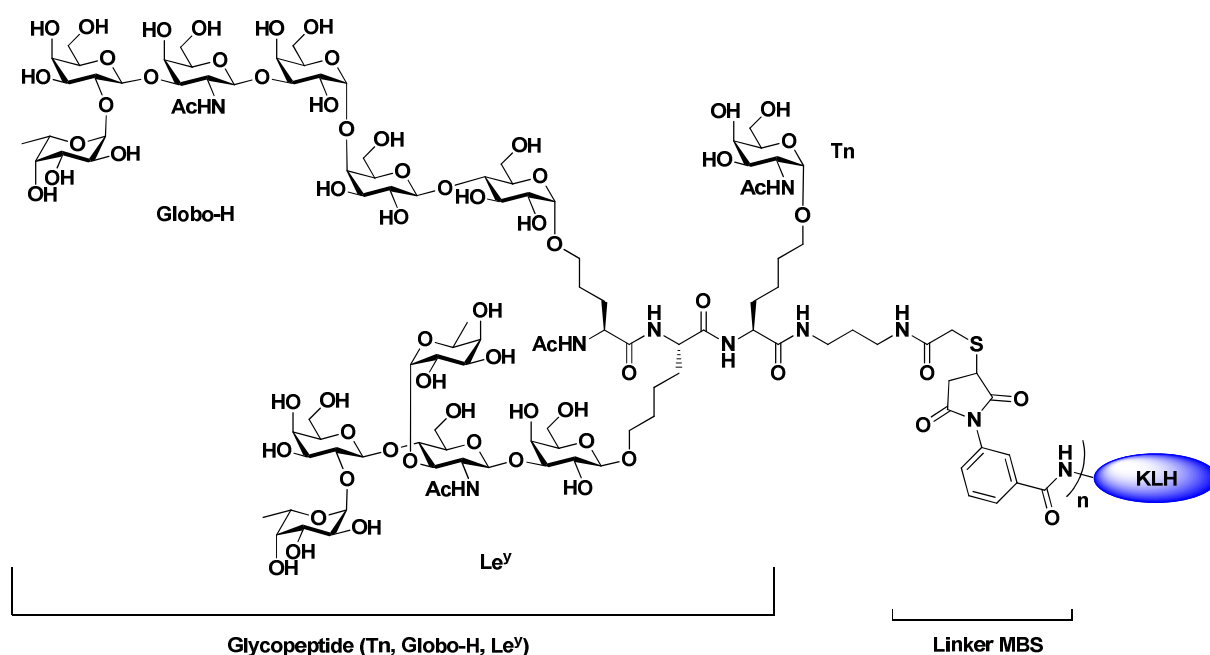


Figure 1.19: Vaccin unimoléculaire trivalent.

Par la suite, une structure pentavalente a été élaborée, regroupant 5 antigènes liés au cancer de la prostate et au cancer du sein, tels que Globo-H, Le^y, STn, TF et Tn.⁷⁹ Après immunisation des souris, les anticorps (IgM et IgG) décelés ont prouvé qu'ils pouvaient interagir

⁷⁷ Allen, J. R.; Harris, C. R.; Danishefsky, S. J. Pursuit of Optimal Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines: Preparation of a Multiantigenic Unimolecular Glycopeptide Containing the Tn, MBr1, and Lewis^y Antigens. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 1890-1897.

⁷⁸ Ragupathi, G.; Coltart, D. M.; Williams, L. J.; Koide, F.; Kagan, E.; Allen, J.; Harris, C.; Glunz, P. W.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. On the power of chemical synthesis: Immunological evaluation of models for multiantigenic carbohydrate-based cancer vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, 13699-13704.

⁷⁹ Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. Prospects for total synthesis: A vision for a totally synthetic vaccine targeting epithelial tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 11937-11942.

spécifiquement avec les cellules surexprimant les antigènes cibles.⁸⁰ Cependant, ces anticorps étaient seulement dirigés contre 4 des 5 TACAs introduits. Seul Le^y n'a pas induit de réponses immunitaires. Un candidat vaccin pentavalent unimoléculaire de seconde génération a alors été mis en place en remplaçant, cette fois-ci, Le^y par le ganglioside GM2 (Figure 1.20). Les évaluations pré-cliniques de cette nouvelle construction (avec QS-21) ont été positives où chaque TACA engendre une réponse anticorps.⁸¹ Le remplacement du résidu Le^y par GM2 a ainsi augmenté l'immunogénicité du candidat vaccin. Celui-ci a donc été envoyé en phase clinique I dans le cadre d'un traitement du cancer de la prostate ou du cancer du sein. Des résultats complets sont à venir.

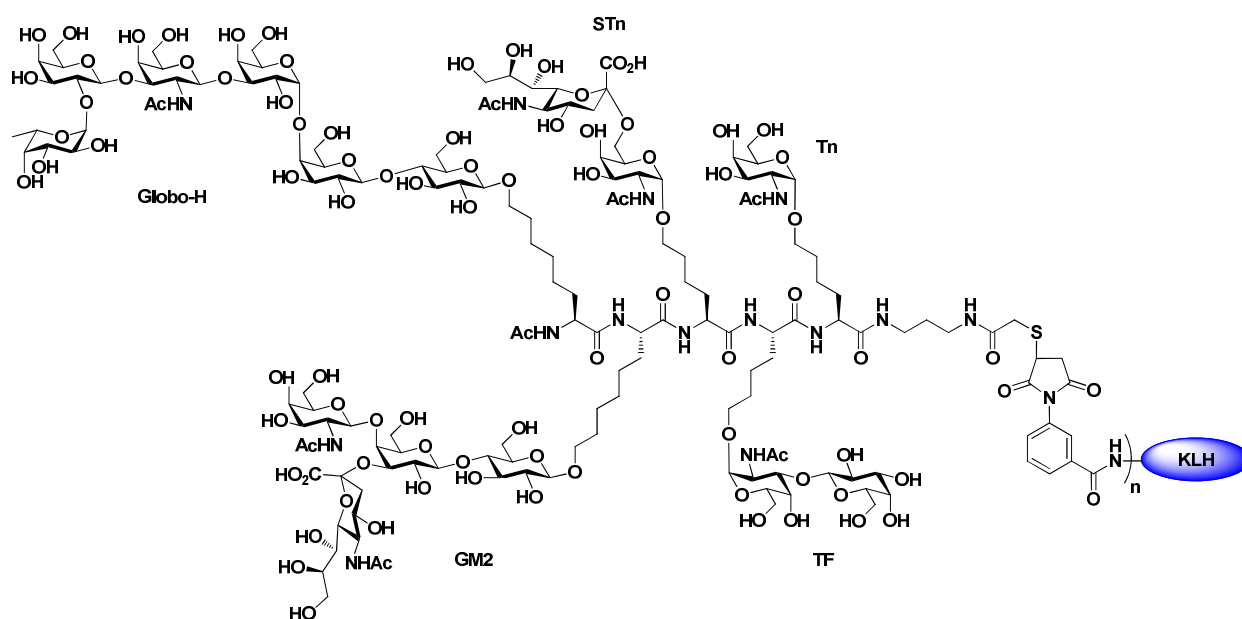


Figure 1.20: Vaccin unimoléculaire pentavalent de seconde génération.

d. Inconvénients liés à l'utilisation d'une protéine porteuse

La majorité des candidats vaccins élaborés sont traditionnellement associés à l'utilisation d'une protéine porteuse comme KLH et d'un immuno-adjuvant non spécifique QS-21 afin d'exacerber la réponse immunitaire dépendante des cellules T_H. Néanmoins, l'emploi de cette protéine peut être problématique. Premièrement, les techniques de conjugaison chimique de cette protéine à un domaine saccharidique sont, en général, difficiles à contrôler et peuvent être liées à

⁸⁰ Ragupathi, G.; Koide, F.; Livingston, P. O.; Cho, Y. S.; Endo, A.; Wan, Q.; Spassova, M. K.; Keding, S. J.; Allen, J.; Ouerfelli, O.; Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. Preparation and Evaluation of Unimolecular Pentavalent and Hexavalent Antigenic Constructs Targeting Prostate and Breast Cancer: A Synthetic Route to Anticancer Vaccine Candidates. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2715-2725.

⁸¹ Zhu, J.; Wan, Q.; Lee, D.; Yang, G.; Spassova, M. K.; Ouerfelli, O.; Ragupathi, G.; Damani, P.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. From Synthesis to Biologics: Preclinical Data on a Chemistry Derived Anticancer Vaccine. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 9298-9303.

de nombreuses ambiguïtés en terme de composition et de structure. Elles ne sont donc pas reproductibles.

Due à son importante immunogénicité, cette protéine porteuse peut être à l'origine de fortes réponses immunitaires dirigées contre elles. Cet effet entraîne une diminution des anticorps reconnaissant les TACAs. On parle ici de suppression épitopique induite par la protéine porteuse. Le linker peut également être responsable de cette suppression épitopique. L'équipe de G-J. Boons a ainsi découvert que le composé sulfo-SMCC (sulfosuccinimidyl-4-(*N*-maléimidométhyl) cyclohexane-1-carboxylate), souvent utilisé lors de ligations chimiques, réduit fortement la réponse anticorps contre l'antigène Le^y. Les IgM et les IgG étaient principalement dirigés contre le linker lui-même.⁸² Par contre, lorsque ce linker est remplacé par un autre plus flexible et plus petit, le SBAP (succinimidyl 3-(bromoacétamido) propionate), la réponse anti-linker est plus faible laissant la place à une réponse immune robuste envers Le^y. De plus, malgré l'efficacité établie pour ce type de candidat vaccin lors des tests pré-cliniques, leur succès en phase clinique reste mitigée. Ils sont la plupart du temps tolérés par l'organisme, ils sont peu toxiques et n'induisent pas de réactions auto-immunes mais les anticorps qu'ils engendrent sont rarement de type IgG avec de hautes affinités pour les antigènes cibles. A côté de tout cela, l'argument principal est que le design des effets cliniques n'était pas optimal à savoir que les tests étaient effectués chez des patients en dernier recours et que les espacement dans le temps entre ces tests n'étaient pas pris en compte. De nos jours, les patients cibles sont plutôt immuno-compétents, c'est-à-dire avec un système immunitaire plus efficace. De plus, les tests sont toujours réalisés en association avec les traitements usuels du cancer.

Plusieurs groupes ont alors apporté quelques alternatives aux problématiques évoquées. Certains ont modifié chimiquement la structure des antigènes saccharidiques, notamment en ajoutant des atomes de fluor.⁸³ Ye et al. ont travaillé dans ce sens.⁸⁴ Ils ont synthétisé de nombreux analogues de l'antigène STn portant un ou deux atomes de fluor sur différentes positions, et l'ensemble a été conjugué à KLH (Figure 1.21). Ces modifications ont permis

⁸² Buskas, T.; Li, Y.; Boons, G-J. The Immunogenicity of the Tumor-Associated Antigen Lewis^y May Be Suppressed by a Bifunctional Cross-Linker Required for Coupling to a Carrier Protein. *Chemistry - A European Journal* **2004**, *10*, 3517-3524.

⁸³ Hoffmann-Röder, A.; Kaiser, A.; Wagner, S.; Gaidzik, N.; Kowalczyk, D.; Westerlind, U.; Gerlitzki, B.; Schmitt, E.; Kunz, H. Synthetic Antitumor Vaccines from Tetanus Toxoid Conjugates of MUC1 Glycopeptides with the Thompson-Friedenreich Antigen and a Fluorine-Substituted Analogue. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 8498-8503.

⁸⁴ Yang, F.; Zheng, X-J.; Huo, C-X.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Ye, X-S.; Enhancement of the Immunogenicity of Synthetic Carbohydrate Vaccines by Chemical Modifications of STn Antigen. *ACS Chemical Biology* **2011**, *6*, 252-259.

d'augmenter le taux d'anticorps IgG anti-STn et d'améliorer le ratio IgG/IgM. Ces anticorps ont démontré qu'ils reconnaissaient les cellules tumorales qui présentent la forme STn native.

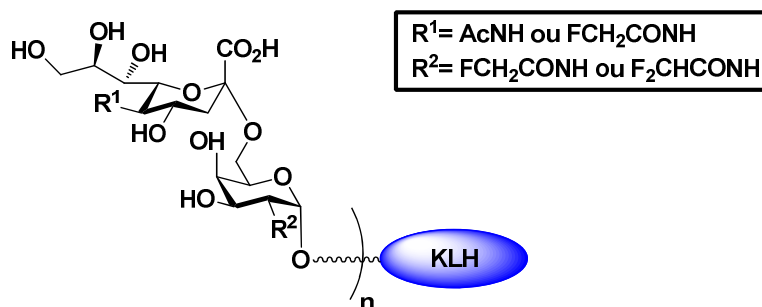


Figure 1.21: Vaccin glycoconjugué avec une ou plusieurs modifications des structures antigéniques.

Le remplacement de la protéine porteuse KLH par des particules virales VLPs (*Virus-Like Particules*) a également été envisagé. Ces particules sont composées de plusieurs sous-unités protéiques assemblées de manière hautement ordonné. Leur caractère non infectieux et très immunogène sont dus à différentes propriétés favorables telles que:

- Leur taille (<100 nm de diamètre), qui favorise leur assimilation par les APCs.
- Leur structure répétitive, qui facilite la reconnaissance par les cellules B.
- Leur capacité à se lier aux récepteurs BCRs des cellules B.

De plus, ces VLPs engendrent une présentation très dense des antigènes saccharidiques au système immunitaire. M. G. Finn, X. Huang et leurs collaborateurs⁸⁵ ont notamment développé un glycoconjugué Q β -Tn (Figure 1.22) dans lequel ils ont installé de nombreuses copies de l'antigène Tn. Cette construction a démontré lors des tests pré-cliniques, sa capacité à induire une grande quantité d'IgG anti-Tn.

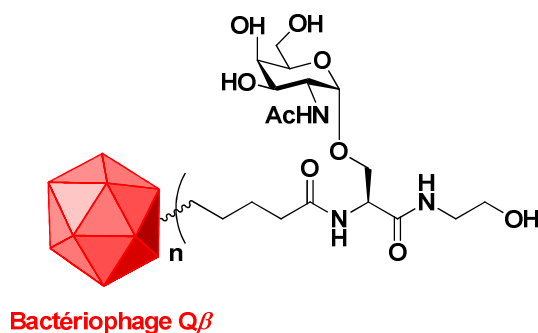


Figure 1.22: Vaccin glycoconjugué de type Q β -Tn.

⁸⁵ Yin, Z.; Cormellas-Aragones, M.; Chowdhuri, S.; Bentley, P.; Kaczanowska, K.; BenMohamed, L.; Gildersleeve, J. C.; Finn, M. G.; Huang, X. Boosting Immunity to Small Tumor-Associated with Bacteriophage Q β Capsids. *ACS Chemical Biology* **2013**, 8, 1253-1262.

D'autres laboratoires ont élaboré des approches conduisant à des candidats vaccins comprenant plusieurs composantes. Ces approches évitent l'emploi de protéines immunogènes et incluent seulement les éléments nécessaires dans le but d'induire des réponses immunitaires innées et humorales plus ciblées ainsi que plus spécifiques de l'antigène saccharidique.

3. Vaccins synthétiques à deux composantes

Une première possibilité pour améliorer la présentation des TACAs au système immunitaire est de les conjuguer à un ligand qui cible et active les récepteurs des cellules immunitaires appropriées. Quelques exemples relatent la conjugaison d'agonistes des récepteurs Toll (TLRs).

a. Les TLRs

Les TLRs ont un rôle central dans l'immunité.^{41,42} Ils sont exprimés par les DCs, les macrophages et également les lymphocytes B. Ce sont des protéines transmembranaires de type I qui partagent des éléments structuraux communs dans la région extracellulaire, correspondant à des segments répétés de 24 à 29 acides aminés. Ils comportent la séquence xLxxLxLxx où x est n'importe quel acide aminé et où L est une leucine. Ces motifs structuraux sont des répétitions riches en leucine ou LRRs (pour *Leucin-Rich Repeats*). Tous les TLRs contiennent plusieurs LRRs formant une région de fixation au ligand extracellulaire. Le domaine intracellulaire des TLRs est appelé TIR (pour *Toll/IL-1 Receptor*). Comme l'illustre la figure 1.23A, les domaines TIRs disposent de trois régions conservées nommées boîtes 1, 2 et 3 qui servent de sites de liaison pour certaines protéines responsables de l'initiation des voies de transduction des signaux par les TLRs.

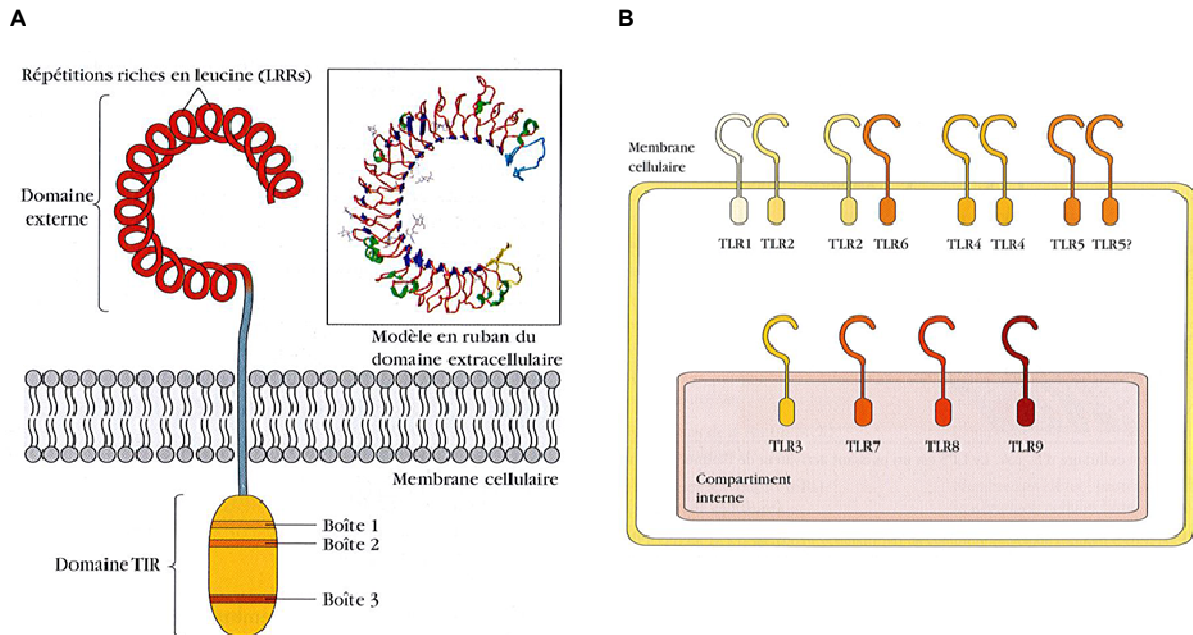


Figure 1.23: Les TLRs chez l'Homme. A) Structure; B) Localisation. D'après Kindt et al.¹

A ce jour, 11 TLRs ont été identifiés chez l'Homme. Comme nous l'avons précisé auparavant, les TLRs reconnaissent des motifs moléculaires appelés PAMPs. De manière saisissante, chaque TLR détecte un répertoire distinct de molécules indispensables aux pathogènes. Les TLRs qui lient les ligands extracellulaires se trouvent à la surface des cellules alors que ceux qui reconnaissent les ligands intracellulaires, tels que l'ARN viral ou l'ADN bactérien, sont localisés dans des compartiments intracellulaires comme les endosomes (Figure 1.23B). Certains TLRs agissent sous forme de dimères. Parmi eux, TLR4 forme un homodimère et il semblerait que ce soit aussi le cas du TLR5. Les TLRs 1, 2 et 6 forment, eux, des hétérodimères. Dans le cas des TLRs 3, 7, 8 et 9 qui peuvent agir comme monomères, aucun partenaire existant n'a encore été mis en évidence. La majeure partie des ligands détectés par les TLRs sont illustrés dans le tableau 1.1. Ainsi, nous pouvons, par exemple, voir que l'appariement du TLR2, soit avec TLR1 soit avec TLR6, modifie sa spécificité de reconnaissance. Par ailleurs, la nature des ligands du TLR10 et du TLR11 n'a pas encore été identifiée.

TLRs	Ligands naturels	Pathogènes cibles
TLR2+TLR1	Lipopeptides triacylés	Mycobactéries
	Protéines	Parasites
TLR2+TLR6	Peptidoglycanes	Bactéries Gram positif
	Lipopeptides diacylés	Mycobactéries
	Zymosane	Levures
TLR3	ARN double brin	Virus
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS)	Bactéries Gram négatif
TLR5	Flagelline	Bactéries
TLR7	ARN simple brin	Virus
TLR8	ARN simple brin	Virus
TLR9	Oligonucléotides avec des	Bactéries
	motifs CpG non méthylés	
TLR10 et TLR11	Inconnus	Inconnus

Tableau 1.1: Nature des ligands reconnus par les TLRs chez l'Homme.

La reconnaissance des PAMPs par les TLRs stimule le recrutement d'adaptateurs protéiques permettant l'enclenchement de différentes voies de signalisation intracellulaire.⁸⁶ Ces adaptateurs interagissent avec les domaines TIRs des TLRs. Le plus commun étant MyD88 (pour *Myeloid Differentiation factor 88*). Cependant, seul TLR3 emploie des voies indépendantes de MyD88. Le recrutement de cet adaptateur peut conduire à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui contrôle l'expression de plusieurs gènes codant pour des cytokines inflammatoires.⁸⁷ De manière générale, l'activation des voies de signalisations des TLRs induit la maturation des APCs et notamment des DCs.⁸⁸ Elles produisent alors des cytokines telles que l'IFN- α , le TNF- α ou l'IL-12 qui stimulent d'autres effecteurs de l'immunité innée et peuvent éventuellement intervenir dans la mise en place de réponses adaptatives. De ce fait, plusieurs groupes et plusieurs industries pharmaceutiques ont développé des agonistes synthétiques⁸⁹ mimant les ligands naturels des TLRs afin de les utiliser comme adjuvants de vaccins⁹⁰ ou comme agents anti-

⁸⁶ Kawai, T.; Akira, S. TLR signaling. *Seminars in Immunology* **2007**, *19*, 24-32.

⁸⁷ Hemmi, H.; Kaisho, T.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Sanjo, H.; Hoshino, K.; Horiuchi, T.; Tomikawa, H.; Takeda, K.; Akira, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology* **2002**, *3*, 196-200.

⁸⁸ Pulendran, B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunological Reviews* **2004**, *199*, 227-250.

⁸⁹ Romagne, F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 80-87.

⁹⁰ Cooper, C. L.; Davis, H. L.; Morris, M. L.; Efler, S. M.; Al Adhami, M.; Krieg, A. M.; Cameron, D. W.; Heathcote, J. CPG 7909, an Immunostimulatory TLR9 Agonist Oligodeoxynucleotide, as Adjuvant to Engerix-B® HBV Vaccine in Healthy Adults: A Double-Blind Phase I/II Study. *Journal of Clinical Immunology* **2004**, *24*, 693-701.

infectieux⁹¹ ou anti-cancéreux.⁹² Certains ont même été commercialisés.⁹³ Nous pouvons citer, par exemple, l'Imiquimod (Aldara[®], 3M), agoniste du TLR7 de la famille des imidazoquinolines, employé sous forme de crème. Il a été approuvé pour le traitement du carcinome basocellulaire superficiel.⁹⁴ De fortes activités anti-tumorales ont également été démontrées, en phases cliniques, pour le traitement du mélanome métastatique.⁹⁵

Seder et ses collaborateurs ont, de leur côté, mis en exergue que la conjugaison d'un agoniste du TLR7 et du TLR8, comme le Resiquimod (R-848), avec la protéine antigénique HIV-1 Gag, augmentait l'induction de réponses immunitaires cellulaires et humorales chez la souris⁹⁶ ainsi que chez les primates non humains.⁹⁷

Cette capacité à pouvoir engendrer une stimulation efficace de nombreux composants du système immunitaire, montrent toute l'importance que revêt l'utilisation d'un agoniste d'un récepteur TLR dans la conception d'un candidat vaccin pour le traitement du cancer.

b. Exemples de vaccins associant TACAs et ligand des TLRs

Pour commencer, nous pouvons citer le travail effectué par Toyokuni et al.^{98,99} qui met en évidence l'emploi d'un agoniste de TLR2, le lipopeptide Pam₃Cys (ou P₃CS), relié de manière covalente à une structure dimérique portant deux antigènes Tn par l'intermédiaire de l'acide 4-aminobutyrique, pris comme espaceur (Figure 1.24). Bien que ce glycoconjugué n'ai seulement

⁹¹ Horsmans, Y.; Berg, T.; Desager, J-P.; Mueller, T.; Schott, E.; Fletcher, S. P.; Steffy, K. R.; Bauman, L. A.; Kerr, B. M.; Averett, D. R. Isatoribine, an Agonist of TLR7, Reduces Plasma Virus Concentration in Chronic Hepatitis C Infection. *Hepatology* **2005**, 42, 724-731.

⁹² Smits, E. L. J. M.; Ponsaerts, P.; Berneman, Z. N.; Van Tendeloo, V. F. I. The Use of TLR7 and TLR8 Ligands for the Enhancement of Cancer Immunotherapy. *The Oncologist* **2008**, 13, 859-875.

⁹³ Baldrige, J. R.; McGowan, P.; Evans, J. T.; Cluff, C.; Mossman, S.; Johnson, D.; Persing, D. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opinion in Biological Therapy* **2004**, 4, 1129-1138.

⁹⁴ Geisse, J.; Caro, I.; Lindholm, J.; Golitz, L.; Stampone, P.; Owens, M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2004**, 50, 722-733.

⁹⁵ Ray, C. M.; Kluk, M.; Grin, C. M.; Grant-Kels, J. M. Successful treatment of malignant melanoma *in situ* with topical 5% imiquimod cream. *International Journal of Dermatology* **2005**, 44, 428-434.

⁹⁶ Wille-Reece, U.; Wu, C-y.; Flynn, B. J.; Kedl, R. M.; Seder, R. A. Immunization with HIV-1 Gag Protein Conjugated to a TLR7/8 Agonist Results in the Generation of HIV-1 Gag-Specific Th1 and CD8⁺ T Cell Responses. *The Journal of Immunology* **2005**, 174, 7676-7683.

⁹⁷ Wille-Reece, U.; Flynn, B. J.; Loré, K.; Koup, R. A.; Kedl, R. M.; Mattapallil, J. J.; Weiss, W. R.; Roederer, M.; Seder, R. A. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8⁺ T cell responses in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 15190-15194.

⁹⁸ Toyokuni, T.; Dean, B.; Cai, S.; Boivin, D.; Hakomori, S-I.; Singhal, A. K. Synthetic Vaccines: Synthesis of a Dimeric Tn Antigen-Lipopeptide Conjugate That Elicits Immune Responses against Tn-Expressing Glycoproteins. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 395-396.

⁹⁹ Toyokuni, T.; Hakomori, S-I.; Singhal, A. K. Synthetic Carbohydrate Vaccines: Synthesis and Immunogenicity of Tn Antigen Conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1994**, 2, 1119-1132.

induit qu'une faible quantité d'IgG, cette étude a démontré qu'un antigène saccharidique synthétique pouvait favoriser une réponse immunitaire sans l'utilisation d'une macromolécule porteuse.

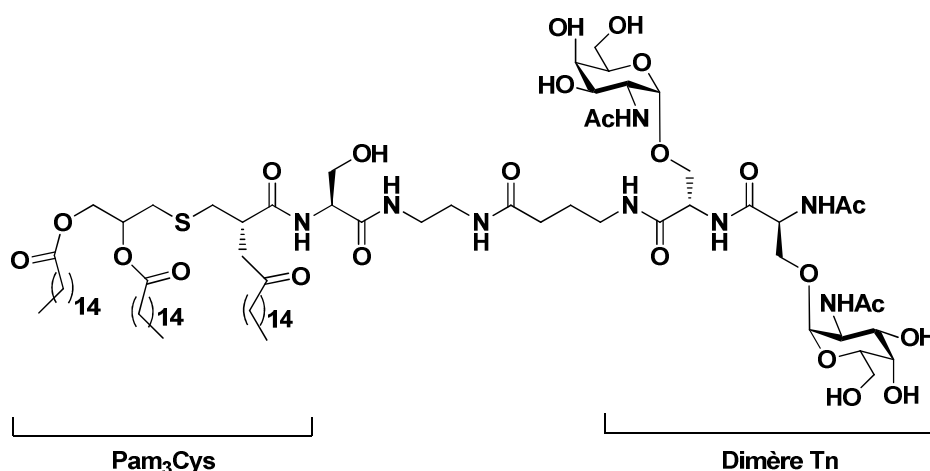


Figure 1.24: Vaccin conjuguant un glycopeptide dimérique Tn et le lipopeptide Pam₃Cys.

La même méthode a été développée par Danishefsky et ses collaborateurs, en conjuguant un glycocluster trimérique Le^y à Pam₃Cys.^{100, 101} Ce glycocluster engendre, chez les souris immunisées, la production d'une quantité plus importante d'anticorps en comparaison avec celle obtenue avec la construction portant une seule copie de l'antigène Le^y. Ces anticorps ont, par ailleurs prouvé, qu'ils reconnaissent les cellules cancéreuses qui expriment l'épitope Le^y naturel. Cependant, ils étaient majoritairement de type IgM et l'ajout de l'immuno-adjuvant externe QS-21 n'a pas permis une commutation de classe vers les IgG. Comme nous l'avons évoqué auparavant, ces mêmes auteurs ont construit des candidats vaccins multi-antigéniques unimoléculaires comprenant les TACAs Globo-H, Le^y, Tn, STn et TF attachés à un squelette peptidique. Le glycopeptide généré n'a pas seulement été associé à la protéine KLH, mais également au lipopeptide Pam₃Cys. Dans cette optique, les tests pré-cliniques effectués en présence de QS-21, ont révélé la formation d'anticorps dirigés contre tous les épitopes introduits. Malheureusement, les anticorps mesurés appartenaient principalement à la classe IgM. Tous ces résultats mettent en exergue que cette production importante d'IgM est sûrement due à l'absence

¹⁰⁰ Kudryashov, V.; Glunz, P. W.; Williams, L. J.; Hintermann, S.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Toward optimized carbohydrate-based anticancer vaccines: Epitope clustering, carrier structure, and adjuvant all influence antibody responses to Lewis^y conjugates in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 3264-3269.

¹⁰¹ Glunz, P. W.; Hintermann, S.; Schwarz, J. B.; Kuduk, S. D.; Chen, X-T.; Williams, L. J.; Sames, D.; Danishefsky, S. J.; Kudryashov, V.; Lloyd, K. O. Probing Cell Surface "Glyco-Architecture through Total Synthesis. Immunological Consequences of a Human Blood Group Determinant in a Clustered Mucin-like Context. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, 10636-10637.

d'épitopes des cellules T_H qui favorisent la commutation de classe vers les IgG ainsi qu'une maturation de l'affinité de ces anticorps. Il subsiste, cependant, quelques exceptions comme celle développée par A. Spadaro, G. Geraci et leurs collaborateurs.¹⁰² Le candidat vaccin présente un "scaffold" non peptidique de type calix[4]arène porteur de quatre copies d'une unité glycomimétique de l'antigène Tn (S-Tn). Cet édifice, a été couplé à Pam₃Cys et a ensuite montré lors des tests biologiques *in vivo* qu'il stimulait la production d'IgG anti-Tn (Figure 1.25).

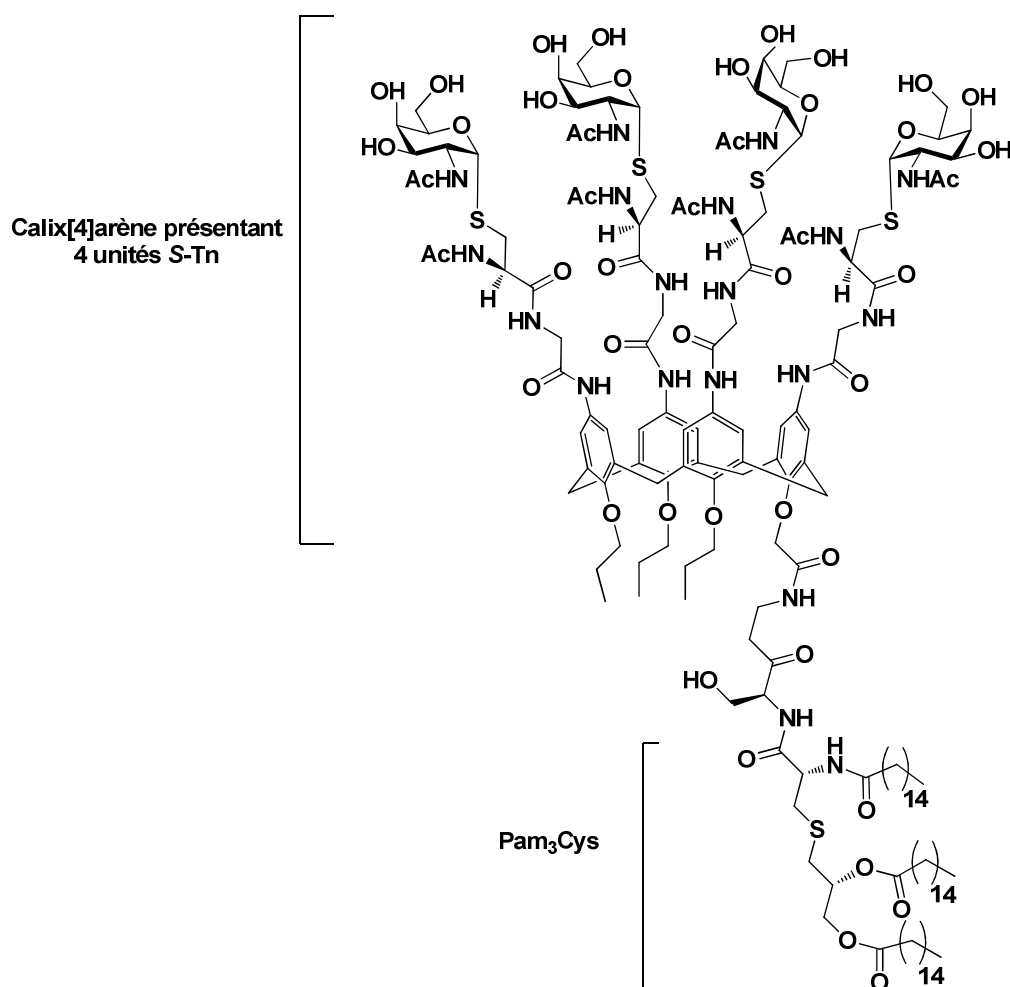


Figure 1.25: Calix[4]arène décoré avec quatre unités glycomimétiques S-Tn et avec l'adjuvant Pam₃Cys.

¹⁰² Geraci, C.; Consoli, G. M. L.; Galante, E.; Bousquet, E.; Pappalardo, M.; Spadaro, A. Calix[4]arene Decorated with Four Tn Antigen Glycomimetic Units and P3CS Immunoadjuvant: Synthesis, Characterization, and Anticancer Immunological Evaluation. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 751-758.

c. Vaccins comportant des épitopes peptidiques des cellules T_H

Plusieurs groupes ont mis en place des structures à deux composantes incorporant des TACAs et un épitope des cellules T_H.¹⁰³ Ce système permet d'améliorer l'interaction entre les cellules T_H et les cellules B entraînant l'induction de forts taux d'anticorps et une commutation de classe vers les IgG.

L'équipe de H. Kunz a élaboré un glycopeptide dérivé de MUC1 portant un seul groupement STn (épitope des cellules B).¹⁰⁴ L'ensemble a été couplé au peptide OVA 323-339 assimilé à un épitope T_H (Figure 1.26). Cette structure a été co-administrée avec l'adjuvant CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) à des souris transgéniques exprimant des récepteurs TCRs spécifiques de ce peptide OVA. Les résultats ont dévoilé la présence de taux importants d'anticorps spécifiques du peptide MUC1 glycosylé. Le même type de résultats a été obtenu avec un glycopeptide MUC1 présentant à la fois l'antigène STn et l'antigène Tn.¹⁰⁵

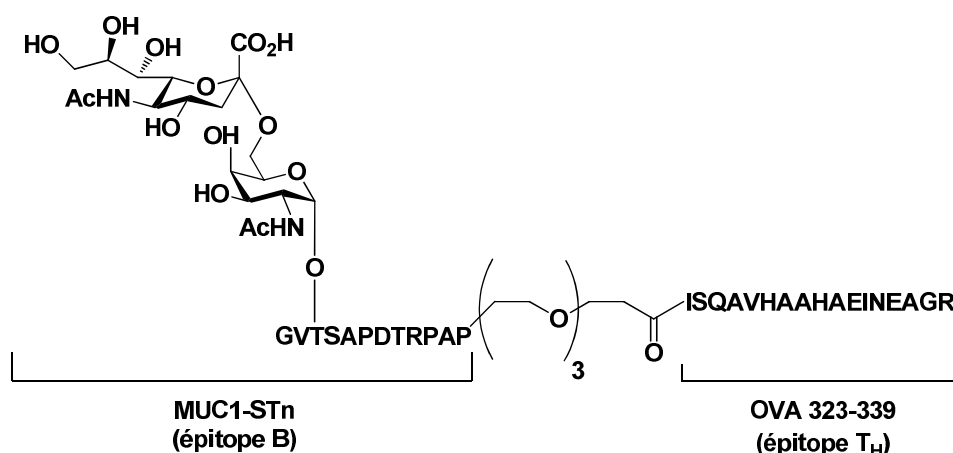


Figure 1.26: Vaccin à deux composantes incorporant un glycopeptide dérivé de MUC1 et un épitope T_H.

Afin de mimer les glycosylations hétérogènes des peptides dérivés de MUC1, le groupe de A. Delmas a synthétisé un candidat vaccin contenant trois épitopes différents des cellules B, à savoir une unité MUC1 non glycosylée, une autre présentant l'antigène Tn et une dernière avec

¹⁰³ Bay, S.; Fort, S.; Birikaki, L.; Ganneau, C.; Samain, E.; Coïc, Y.-M.; Bonhomme, F.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Lo-Man, R. Induction of a Melanoma-Specific Antibody Response by a Monovalent, but not a Divalent, Synthetic GM2 Neoglycopeptide. *ChemBioChem* **2009**, *4*, 582-587.

¹⁰⁴ Dziadek, S.; Hobel, A.; Schmitt, E.; Kunz, H. A Fully Synthetic Vaccine Consisting of a Tumor-Associated Glycopeptide Antigen and a T-Cell Epitope for the Induction of a Highly Specific Humoral Immune Response. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 7630-7635.

¹⁰⁵ Westerlind, U.; Hobel, A.; Gaidzik, N.; Schmitt, E.; Kunz, H. Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigens and a T-Cell Epitope for the Induction of a Highly Specific Humoral Immune Response. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 7551-7556.

l'antigène TF (Figure 1.27).¹⁰⁶ Ces épitopes ont été conjugués à un épitope T_H, le peptide PADRE (*Pan-DR epitope*). Les souris immunisées avec cette construction et avec l'alun (adjuvant), ont produit des IgG dirigés contre tous les épitopes des cellules B reconnaissant les épitopes natifs observés à la surface des cellules cancéreuses du sein.

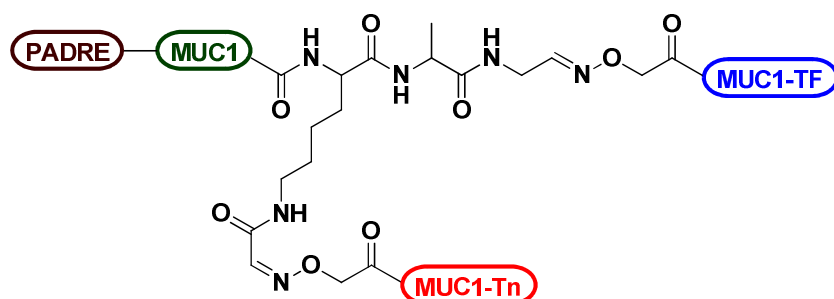


Figure 1.27: Vaccin incorporant trois épitopes B et un épitope T_H.

C. Leclerc et ses collaborateurs ont développé un immunogène synthétique, le MAG (*Multiple Antigenic Glycopeptide*), dans le but de générer des taux élevés d'anticorps (IgM et IgG) spécifiques de l'antigène Tn. La première version du MAG synthétisée comprenait un squelette polylysine non-immunogène avec quatre bras.^{107,108} Chaque bras était composé d'un épitope des cellules T CD₄⁺ (peptide du virus de la polio PV) et d'une copie de l'antigène Tn. L'immunisation des souris avec cette construction MAG:Tn-PV, en présence de l'alun comme adjuvant, a induit une réponse humorale très encourageante. Néanmoins, l'affinité et la diversité des anticorps anti-Tn établies n'étaient probablement pas aussi importantes qu'elles auraient dû l'être pour détruire efficacement la tumeur. En fait, il a été démontré que l'antigène saccharidique Tn exprimé sur les glycoprotéines de types mucines à la surface des cellules cancéreuses, peut être reconnu par différents anticorps monoclonaux sous forme de cluster.¹⁰⁹ L'anticorps monoclonal MLS128,

¹⁰⁶ Cremer, G.-A.; Bureau, N.; Piller, V.; Kunz, H.; Piller, F.; Delmas, A. F. Synthesis and Biological Evaluation of a Multiantigenic Tn/TF-Containing Glycopeptide Mimic of the Tumor-Related MUC1 Glycoprotein. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965-968.

¹⁰⁷ Bay, S.; Lo-Man, R.; Osinaga, E.; Nakada, H.; Leclerc, C.; Cantacuzène, D. Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. *Journal of Peptide Research* **1997**, *49*, 620-625.

¹⁰⁸ Lo-Man, R.; Bay, S.; Vichier-Guerre, S.; Dériaud, E.; Cantacuzène, D.; Leclerc, C. A Fully Synthetic Immunogen Carrying a Carcinoma-associated Carbohydrate for Active Specific Immunotherapy. *Cancer Research* **1999**, *59*, 1520-1524.

¹⁰⁹ Reddish, M. A.; Jackson, L.; Koganty, R. R.; Qiu, D.; Hong, W.; Longenecker, B. M. Specificities of anti-sialyl-Tn and anti-Tn monoclonal antibodies generated using novel clustered synthetic glycopeptide epitopes. *Glycoconjugate Journal* **1997**, *14*, 549-560.

identifié comme étant un anticorps anti-Tn, a montré qu'il reconnaissait des épitopes caractérisés par trois Tn consécutifs.^{110,111}

Ainsi, C. Leclerc et ses collaborateurs ont décidé de synthétiser une seconde version du MAG où chaque bras se rapproche des motifs multi-antigéniques exprimés par les mucines. Ils ont introduit un cluster trimérique Tn afin de mimer au mieux les sources natives Tn présentes sur les cellules tumorales.¹¹² Le MAG:Tn3-PV dendrimérique obtenu (Figure 1.28), a été inoculé chez la souris avec l'alun. Lors des protocoles prophylactiques ou thérapeutiques, les réponses immunitaires produites ont permis d'augmenter le taux de survie jusqu'à 80% chez des souris cancéreuses. Pendant ces tests, le MAG:Tn3-PV a également démontré qu'il présentait une immunogénicité plus élevée et qu'il était à l'origine de réponses humorales qui persistent plus longtemps en comparaison avec celles observées avec la première version du MAG.

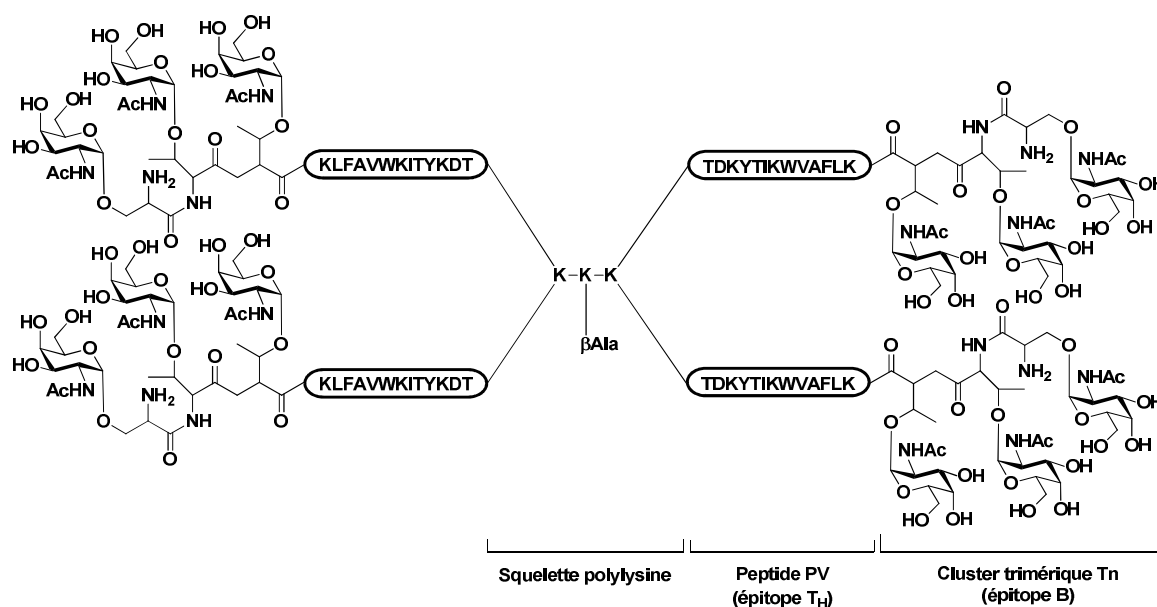


Figure 1.28: Représentation schématique du MAG:Tn3-PV.

De plus, la quantité d'IgG générée était supérieure à celle obtenue avec le glycoconjugué comprenant le cluster trimérique Tn lié à la protéine KLH. Ce système MAG immunogène est capable d'activer le système immunitaire en présence d'un adjuvant inoffensif et toléré par

¹¹⁰ Nakada, H.; Inoue, M.; Numata, Y.; Tanaka, M.; Funakoshi, I.; Fukui, S.; Mellors, A.; Yamashina, I. Epitopic structure of Tn glycoprotein A for an anti-Tn antibody (MLS 128). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90, 2495-2499.

¹¹¹ Nakada, H.; Numata, Y.; Inoue, M.; Tanaka, M.; Kitagawa, H.; Funakoshi, I.; Fukui, S.; Yamashina, I. Elucidation of an Essential Structure Recognized by an Anti-GalNAc α -Ser(Thr) Monoclonal Antibody (MLS 128)*. *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 12402-12405.

¹¹² Lo-Man, R.; Vichier-Guerre, S.; Bay, S.; Dériaud, E.; Cantacuzène, D.; Leclerc, C. Anti-Tumor Immunity Provided by a Synthetic Multiple Antigenic Glycopeptide Displaying a Tri-Tn Glycotope. *The Journal of Immunology* **2001**, 166, 2849-2854.

l'Homme (l'alun) alors que le conjugué Tn(c)-KLH nécessite la co-administration d'un adjuvant plus puissant tel que QS-21. Pour optimiser le développement de leur système MAG, une étude liée à l'influence du squelette aglycone (porteur des résidus α -GalNAc) sur la reconnaissance du glycotope Tn a aussi été entreprise. Cette étude a révélé que le squelette peptidique Ser-Thr-Thr correspondait à la forme la plus adéquate pour induire des anticorps anti-Tn qui interagissent de manière efficiente avec les différents clusters natifs Tn.

En parallèle, afin d'appliquer cette stratégie MAG chez l'Homme, une autre modification importante à cette construction, a été apportée.¹¹³ Un épitope T CD4⁺ universel capable de se lier à de nombreux variants alléliques des molécules humaines de classe II du CMH comme la toxine tétanique TT ou PADRE, a alors été introduit. Ces MAG ont été testés chez des primates non humains entraînant la stimulation d'une production d'IgG anti-Tn qui ont présenté l'aptitude à induire la destruction des cellules cancéreuses exprimant Tn en médiant l'ADCC. Pour finir, on peut ajouter que ce système MAG synthétisé présente l'avantage d'être pur et défini en terme de structure et de composition, ce qui est primordial dans la perspective d'une mise sur le marché.

Dans le but de continuer à exploiter cette notion de cluster pour la présentation efficace de l'antigène Tn au système immunitaire, C. Leclerc, P. Dumy et leurs collaborateurs ont utilisé une structure de type RAFT (*Regioselectivity Addressable Functionalized Template*).¹¹⁴ Ce système est constitué d'un squelette peptidique cyclique porteur de quatre Tn (Figure 1.29). Cette structure a été couplée à un peptide dérivé du virus de la polio (PV - épitope T_H).

¹¹³ Lo-Man, R.; Vichier-Guerre, S.; Perraut, R.; Dériaud, E.; Huteau, V.; BenMohamed, L.; Diop, O. M.; Livingston, P. O.; Bay, S.; Leclerc, C. A Fully Synthetic Therapeutic Vaccine Candidate Targeting Carcinoma-Associated Tn Carbohydrate Antigen Induces Tumor-Specific Antibodies in Nonhuman Primates. *Cancer Research* **2004**, *64*, 4987-4994.

¹¹⁴ Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1149-1159.

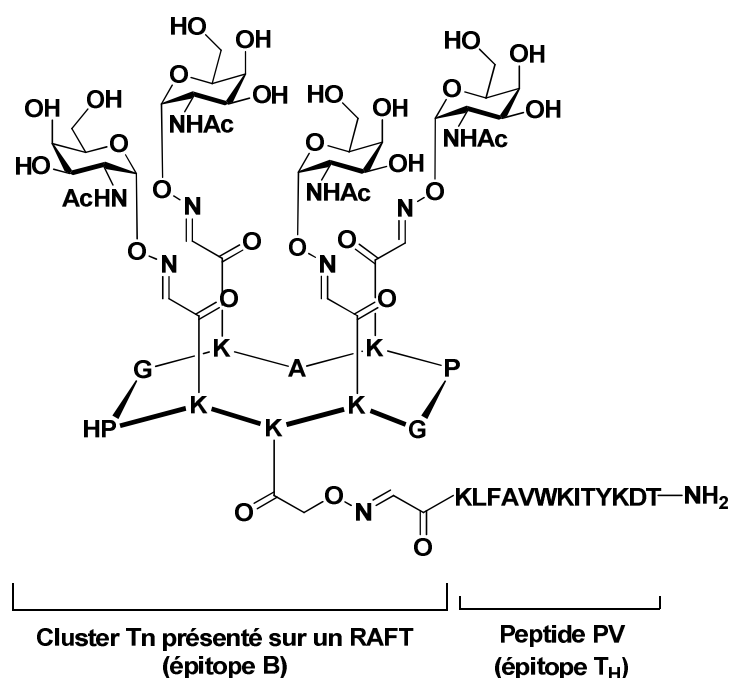


Figure 1.29: Vaccin conjuguant un cluster Tn porté par une structure RAFT et le peptide PV.

Les tests *in vivo* ont mis en exergue la capacité de ce candidat vaccin à stimuler la formation d'anticorps reconnaissant spécifiquement les formes natives Tn retrouvées sur les cellules tumorales humaines.

4. Vaccins synthétiques à composants multiples

Sucheck et al. ont élaboré un candidat vaccin à trois composants sans protéine porteuse.¹¹⁵ La construction définie incorpore un antigène Tn (épitope des cellules B), le peptide YAF de 20 acides aminés (épitope T_H) dérivé de la membrane externe de *Neisseria meningitides* et le rhamnose, pris comme immuno-stimulant (Figure 1.30). Cet élément a été ajouté car plusieurs études ont révélé que le sérum humain contenait de forts taux d'anticorps anti-rhamnose. Par hypothèse, l'introduction du rhamnose favoriserait l'assimilation du candidat vaccin par les APCs et faciliterait, de surcroît, la présentation de l'épitope T_H avec les molécules de classe II du CMH. Ceci peut s'expliquer par le fait que les APCs et plus particulièrement les DCs possèdent des récepteurs Fcγ qui fixent les anticorps liés au rhamnose présents sur le candidat vaccin. Lors des tests pré-cliniques, cette structure a permis la production d'anticorps anti-Tn.

¹¹⁵ Sarkar, S.; Lombardo, S. A.; Herner, D. N.; Talan, R. S.; Wall, K. A.; Sucheck, S. J. Synthesis of a Single-Molecule L-Rhamnose-Containing Three-Component Vaccine and Evaluation of Antigenicity in the Presence of Anti-L-Rhamnose Antibodies. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 17236-17246.

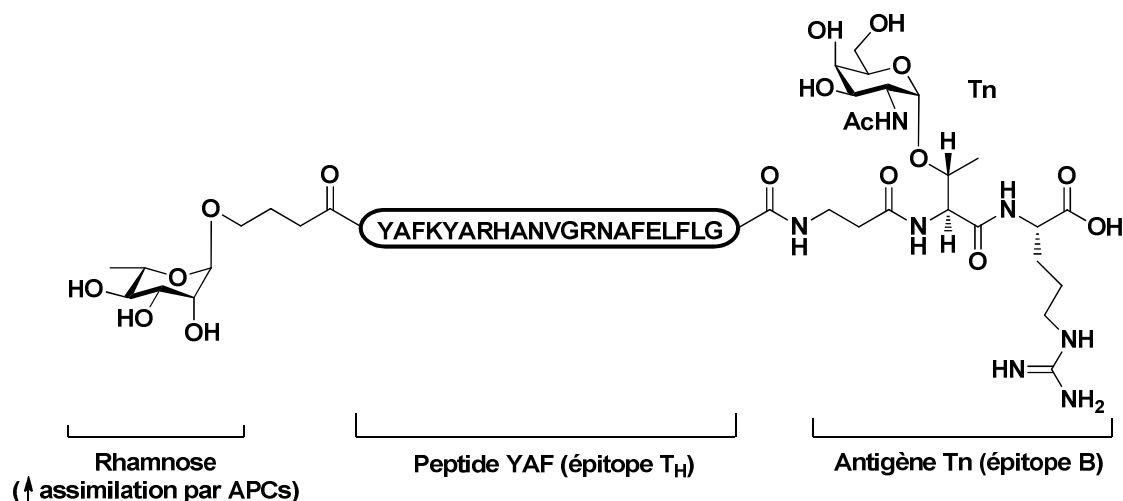
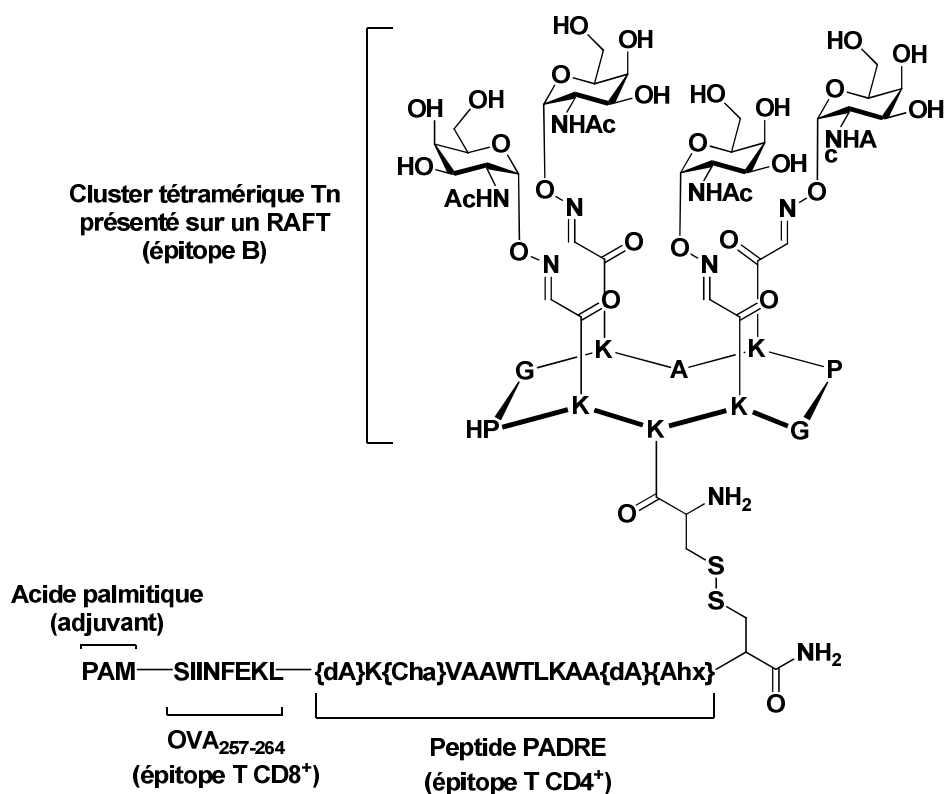


Figure 1.30: Vaccin à trois composants associant des épitopes B et T_H ainsi que le rhamnose.

Après avoir collaboré avec C. Leclerc dans l'élaboration d'un composé basé sur l'utilisation d'une structure cyclique de type RAFT, P. Dumy et al.¹¹⁶ ont, par la suite, complexifié cette construction. Ils ont remplacé le peptide PV par le peptide PADRE et ont ajouté un épitope T CD8⁺ (peptide OVA 257-264) ainsi qu'un adjuvant, l'acide palmitique (Figure 1.31).¹¹⁷ Ce candidat vaccin présente, comme précédemment, quatre antigènes Tn. Cet édifice multivalent et auto-adjuvant a été évalué chez la souris. Les tests ont décrit la présence d'IgG anti-Tn et d'importantes réponses cellulaires T CD4⁺ et T CD8⁺. De plus, cet édifice a démontré, en conditions immuno-thérapeutiques ou immuno-prophylactiques, une diminution de la progression tumorale associée à une augmentation du taux de survie des souris.

¹¹⁶ Renaudet, O.; BenMohamed, L.; Dasgupta, G.; Bettahi, I.; Dumy, P. Towards a Self-Adjuvanting Multivalent B and T cell Epitope Containing Synthetic Glycopeptide Cancer Vaccine. *ChemMedChem* **2008**, 3, 737-741.

¹¹⁷ Bettahi, I.; Dasgupta, G.; Renaudet, O.; Chentoufi, A. A.; Zhang, X.; Carpenter, D.; Yoon, S.; Dumy, P.; BenMohamed, L. Antitumor activity of a self-adjuvanting glyco-lipopeptide vaccine B cell, CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2009**, 58, 187-200.



Avec: dA= L-alanine; Cha= cyclohexylalanine; Ahx= L-acide 2-aminohexanoïque.

Figure 1.31: Vaccin à quatre composantes avec un cluster Tn porté par une structure RAFT.

Le laboratoire de G-J. Boons a, de son côté, développé un candidat vaccin à trois composantes contenant un épitope des cellules B, un épitope des cellules T_H et un agoniste des TLRs pris comme immuno-adjuvant. Un premier modèle a été mis en place conjuguant l'antigène Tn, le peptide YAF et le lipopeptide Pam₃Cys (ligand de TLR2).¹¹⁸ Cette structure a été incorporée dans un liposome et son immunogénicité a été évaluée chez la souris en présence ou en absence de QS-21. Les résultats furent prometteurs avec malgré tout des quantités relativement modérées en IgG anti-Tn. Dans une étude postérieure, une autre construction composée d'un glycopeptide MUC1-Tn (épitope B), d'une séquence peptidique dérivée du virus de la polio PV et du ligand Pam₃CysSK₄ a été développée (Figure 1.32).^{119,120} Ce composé, introduit au préalable dans un liposome, a permis l'induction d'un exceptionnel taux d'anticorps IgG. Ces derniers ont prouvé qu'ils reconnaissent efficacement les cellules cancéreuses MCF-7.

¹¹⁸ Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G-J. Towards a Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccine: Synthesis and Immunological Evaluation of a Lipidated Glycopeptide Containing the Tumor-Associated Tn Antigen. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 5985-5988.

¹¹⁹ Ingale, S.; Wolfert, M. A.; Gaekwad, J.; Buskas, T.; Boons, G-J. Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine. *Nature Chemical Biology* **2007**, *3*, 663-667.

¹²⁰ Ingale, S.; Wolfert, M. A.; Buskas, T.; Boons, G-J. Increasing the Antigenicity of Synthetic Tumor-Associated Carbohydrate Antigens by Targeting Toll-Like Receptors. *ChemMedChem* **2009**, *10*, 455-463.

Grâce à cette nouvelle construction, il a été démontré que l'attachement covalent des ces trois sous-unités ainsi que la présentation liposomale étaient nécessaires dans le but d'entraîner une réponse humorale efficace. Notamment, il a été mis en évidence que le ligand Pam₃CysSK₄ favorisait la libération de cytokines, importantes pour l'activation d'autres cellules immunitaires et facilitait l'internalisation du candidat vaccin par les APCs qui expriment le TLR2. L'incorporation de ce type de ligand est donc primordial dans l'obtention de réponses immunitaires optimales.

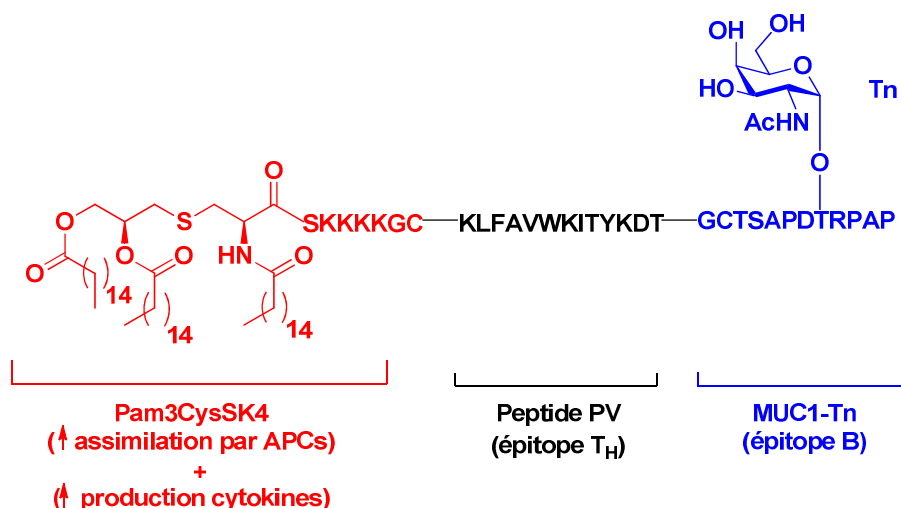


Figure 1.32: Vaccin à trois composantes liant des épitopes B et T_H ainsi qu'un agoniste de TLR2.

Par conséquent, les candidats vaccins synthétiques à base de TACAs présentent un intérêt dans le cadre d'un traitement anti-tumoral. Ces composés peuvent être produits de manières reproductibles et caractérisent des structures chimiquement bien définies. Lors du développement de ces composés, il est possible d'incorporer différents éléments requis pour produire une réponse immunitaire adéquate servant à éradiquer les cellules cancéreuses. Plusieurs éléments peuvent influencer ces réponses immunitaires et notamment les agonistes des TLRs qui sont capables d'activer les cellules dendritiques du système inné.

II. Objectifs et présentation de l'étude

La conception de candidats vaccins entraînant une réponse immunitaire anti-tumorale dans un cadre thérapeutique, est un challenge qui existe depuis de nombreuses années. L'objectif principal qui m'a été confié était l'élaboration de candidats vaccins thérapeutiques à trois composantes, permettant l'activation efficace des DCs, des lymphocytes T_H et des lymphocytes B. La finalité étant la sécrétion d'anticorps IgG reconnaissant spécifiquement la forme native de

l'antigène Tn exprimé à la surface des cellules cancéreuses et induisant la destruction des ces cellules (par CDC ou par ADCC).

L'une des composantes incluse dans l'édifice, est une plateforme β -tripeptoïde *O*- ou *S*-glycosylée par des résidus α -GalNAc (Epitope B - Figure 1.33). Les β -peptoïdes sont des analogues de β -peptides sur lesquels les chaînes latérales ne sont pas portées par les atomes de carbone du squelette mais par l'azote du lien amide. Ils sont peu sensibles aux processus d'hydrolyses enzymatiques (protéases, hydrolases) et disposent d'une grande biodisponibilité, définie notamment par leur importante capacité à traverser les membranes. De manière générale, ils sont faciles à synthétiser et ne présentent pas d'immunogénicité intrinsèque. Toutes ces considération font du squelette β -peptoïde, un outils idéal pour la construction de vaccins anti-tumoraux. Leurs caractérisations complètes, leurs différentes méthodes de synthèse ainsi que leurs applications biologiques vous seront précisément expliciter dans le **chapitre II**. Les résidus GalNAc sont espacés du squelette β -peptoïde par un linker à trois carbones au lieu d'un unique carbone comme dans les chaînes latérales de la sérine ou de la thréonine. Ainsi, la plateforme β -tripeptoïde *O*- ou *S*- α -GalNAc, nous a servi de mime du cluster trimérique Tn naturel. Comme nous l'avons évoqué précédemment, ces clusters sont des cibles privilégiées pour les anticorps monoclonaux. Cet aspect a notamment été démontré par l'anticorps MLS128 qui fixe spécifiquement trois antigènes Tn consécutifs.¹¹¹ Cet "effet cluster" est un critère important pour induire une réponse humorale efficace.

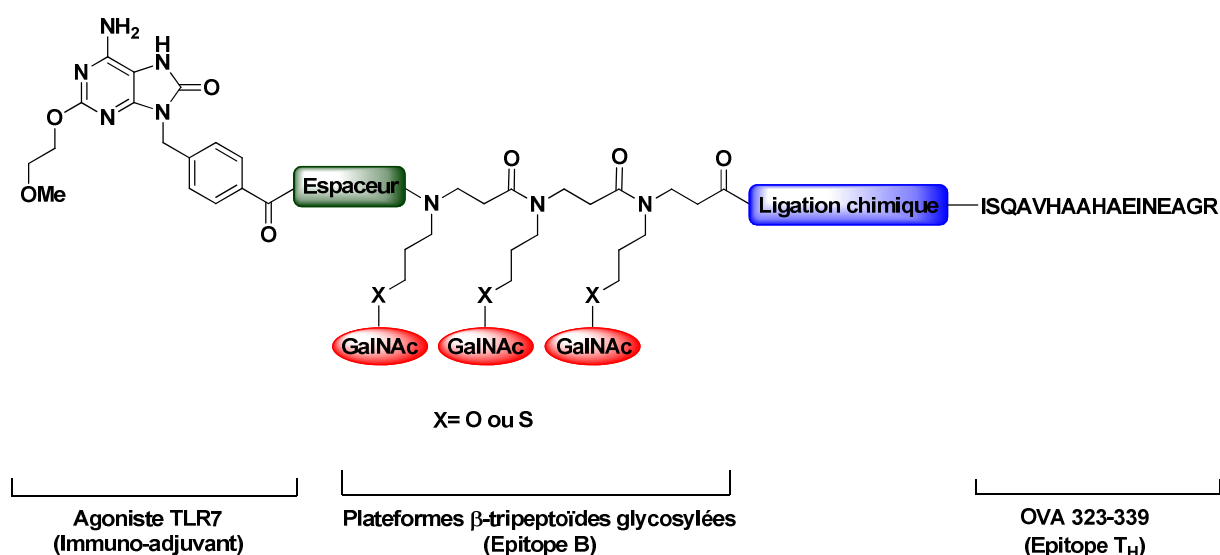


Figure 1.33: Structure de l'édifice candidat vaccin à développer.

Il est également important dans le cadre d'une interaction avec certains récepteurs, et plus particulièrement les lectines de type C (CLRs) exprimés à la surface des DCs. Les CLRs présentent un domaine de reconnaissance des sucres avec un ou plusieurs sites de liaison. Généralement, les interactions multivalentes sont caractérisées par la liaison simultanée de ligands multiples, d'une entité biologique, avec des récepteurs multiples tels que les lectines.¹²¹ Les interactions multivalentes peuvent être collectivement plus fortes que l'ensemble des interactions monovalentes correspondantes.¹²² De ce fait, l'affinité des sucres pour les lectines, présentés sous forme de cluster, est plus élevée que sous forme monomérique. Nous avons choisi, par l'intermédiaire de la plateforme β -tripeptotide glycosylée, de cibler précisément les récepteurs MGLs (*Macrophage Galactose C-type Lectin*). Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire de type II qui possède un unique domaine extracellulaire de reconnaissance des sucres. Il est capable de se lier au galactose et au *N*-acétylgalactosamine (GalNAc). Il est exprimé sur les DCs immatures¹²³ chez l'Homme, la souris et le rat ainsi que sur les macrophages.¹²⁴ Les MGLs sont capables de fixer spécifiquement des clusters saccharidiques comprenant les antigènes TF ou Tn des mucines.^{125,126} Il a été également démontré que les MGLs, qui sont des récepteurs endocytaires, pouvaient favoriser l'internalisation de glycopeptides de types Tn-MUC1 et leur délivrance dans les endosomes conduisant au final à une présentation antigénique avec les molécules de classe II du CMH.¹²⁷ De plus, l'équipe du Pr. C. Leclerc a mis en relief que le ciblage *in vivo* de DCs dermiques, basé sur l'interaction cluster

¹²¹ Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2754-2794.

¹²² Lundquist, J. J.; Toone, E. J. The Cluster Glycoside Effect. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 555-578.

¹²³ Higashi, N.; Fujioka, K.; Denda-Nagai, K.; Hashimoto, S.-i.; Nagai, S.; Sato, T.; Fujita, Y.; Morikawa, A.; Tsuiji, M.; Miyata-Takeuchi, M.; Sano, Y.; Suzuki, N.; Yamamoto, K.; Matsushima, K.; Irimura, T. The Macrophage C-Type Lectin Specific for Galactose/*N*-Acetylgalactosamine Is an Endocytic Receptor Expressed on Monocyte-derived Immature Dendritic Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 20686-20693.

¹²⁴ Denda-Nagai, K.; Kubota, N.; Tsuiji, M.; Kamata, M.; Irimura, T. Macrophage C-type lectin on bone marrow-derived immature dendritic cells is involved in the internalization of glycosylated antigens. *Glycobiology* **2002**, *12*, 443-450.

¹²⁵ Yamamoto, K.; Ishida, C.; Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Konami, Y.; Osawa, T.; Irimura, T. Interaction of Immobilized Recombinant Mouse C-Type Macrophage Lectin with Glycopeptides and Oligosaccharides. *Biochemistry* **1994**, *33*, 8159-8166.

¹²⁶ Suzuki, N.; Yamamoto, K.; Toyoshima, S.; Osawa, T.; Irimura, T. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *The Journal of Immunology* **1996**, *156*, 128-135.

¹²⁷ Napoletano, C.; Rugheri, A.; Argevig Tarp, M. P.; Coleman, J.; Bennett, E. P.; Picco, G.; Sale, P.; Denda-Nagai, K.; Irimura, T.; Mandel, U.; Clausen, H.; Frati, L.; Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J.; Nuti, M. Tumor-Associated Tn-MUC1 Glycoform Is Internalized through the Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin and Delivered to the HLA Class I and II Compartments in Dendritic Cells. *Cancer Research* **2007**, *67*, 8358-8367.

Tn-MGL grâce à leur système MAG, constitue une stratégie prometteuse dans l'optique d'induire une réponse anticorps robuste.¹²⁸

Pour contourner l'immuno-tolérance acquise par les antigènes saccharidiques associés aux tumeurs ("*self-antigen*") de même que leur incapacité à pouvoir induire seuls, une réponse immunitaire dépendante des cellules T_H, nous avons ajouté deux autres éléments immuno-stimulants sur notre construction vaccinale. Le but étant d'améliorer la présentation de notre structure mimétique Tn au système immunitaire. Le premier est un peptide de 17 acides aminés, dérivé de l'ovalbumine: OVA 323-339. Ce peptide contient plusieurs épitopes^{129,130} qui, associés aux molécules de classe II du CMH,^{131,132} peut être reconnu par les récepteurs TCR spécifiques des cellules T_H (Figure 1.33). Le second élément immuno-stimulant correspond à un hétérocycle aromatique, l'acide 4-{[6-amino-2-(2-méthoxyéthoxy)-8-oxo-7H-purine-9(8H)-yl]méthyl} benzonitrile, décrit dans la littérature comme étant un agoniste puissant du récepteur TLR7.¹³³ L'interaction entre cet immuno-adjuvant et le récepteur TLR7, facilite la maturation des DCs.

L'objectif de ma thèse était, par la suite, de soumettre ces édifices candidats vaccins *O*- et *S*-GalNAc à des tests immunologiques (**Chapitre V**). L'intérêt était de valider la fonctionnalité des trois composantes incorporées dans les édifices soulignant leur capacité à induire une réponse immunitaire anti-Tn spécifique. Les tests immunologiques *in vitro* et *in vivo* ont été effectués par l'équipe du Pr. Claude Leclerc (Unité de Regulation Immunitaire et Vaccinologie - INSERM 1041) à l'Institut Pasteur de Paris. Afin de construire les édifices complexes, nous avons développé des stratégies en solution pour synthétiser les trois composantes individuellement et pour les lier ensemble, suivant une chronologie adéquate (1 et 2 - Figure 1.34). Dans un premier temps, nous avons utilisé deux méthodes différentes pour synthétiser les plateformes β -tripeptoides *O*- et *S*-glycosylées (**Chapitre II**). La suite des événements consistait à conjuguer

¹²⁸ Freire, T.; Zhang, X.; Dériaud, E.; Ganneau, C.; Vichier-Guerre, S.; Azria, E.; Launay, O.; Lo-Man, R.; Bay, S.; Leclerc, C. Glycosidic Tn-based vaccines targeting dermal dendritic cells favor germinal center B-cell development and potent antibody response in the absence of adjuvant. *Blood* **2010**, *116*, 3526-3536.

¹²⁹ Robertson, J. M.; Jensen, P. E.; Evavold, B. D. DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope. *The Journal of Immunology* **2000**, *164*, 4706-4712.

¹³⁰ Nakajima-Adachi, H.; Koike, E.; Totsuka, M.; Hiraide, E.; Wakatsuki, Y.; Kiyono, H.; Hachimura, S. Two Distinct Epitopes on the Ovalbumin 323-339 Peptide Differentiating CD4+T Cells into the Th2 or Th1 Phenotype. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2012**, *76*, 1979-1981.

¹³¹ Sun, L-Z.; Elsayed, S.; Aasent, T. B.; Van Do, T.; Aardal, N. P.; Florvaag, E.; Vaali, K. Comparison between Ovalbumine and Ovalbumine Peptide 323-339 Responses in Allergic Mice: Humoral and Cellular Aspects. *Scandinavian Journal of Immunology* **2010**, *71*, 329-335.

¹³² Buus, S.; Colon, S.; Smith, C.; Freed, J. H.; Miles, C.; Grey, H. M. Interaction between a "processed" ovalbumine peptide and Ia molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 3968-3971.

¹³³ Chan, M.; Hayashi, T.; Kuy, C. S.; Gray, C. S.; Wu, C. C. N.; Corr, M.; Wrasidlo, W.; Cottam, H. B.; Carson, D. A. Synthesis and Immunological Characterization of Toll-Like Receptor 7 Agonistic Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 1194-1200.

ces plateformes à l'immuno-adjuvant hétérocyclique, synthétisé au préalable, par l'intermédiaire d'un espaceur (**Chapitre III**). Enfin, deux méthodes de ligation chimique ont été mises en œuvre pour coupler le peptide OVA 323-339, commercial (entreprise Polypeptide Laboratories France) au reste de l'édifice (**Chapitre IV**). La construction de ces édifices complexes met en exergue une approche modulaire convergente qui nous permet, de surcroît, de modifier les trois parties indépendamment les unes des autres.

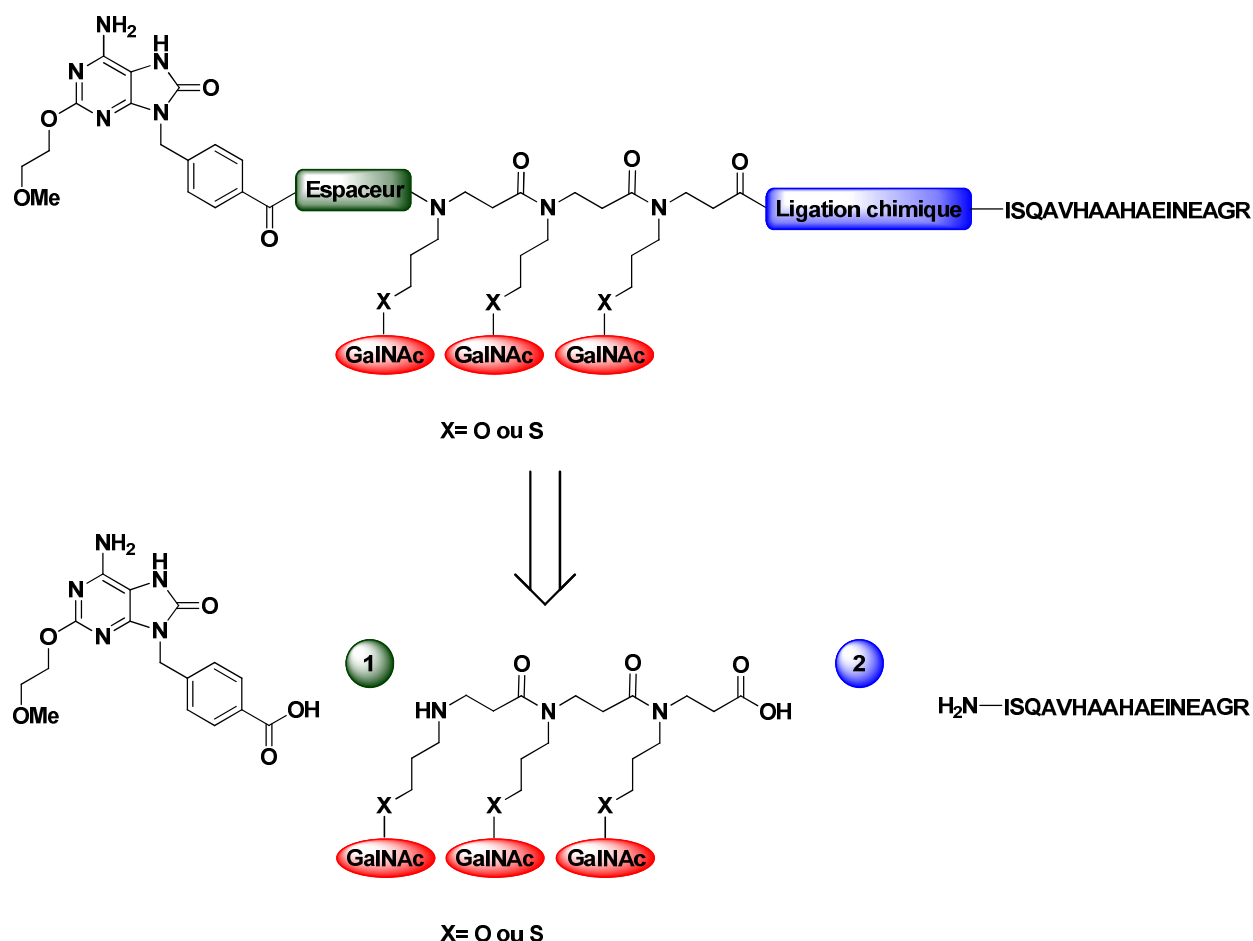


Figure 1.34: Stratégies envisagées pour l'obtention de l'édifice candidat vaccin.

Chapitre II: Accès aux plateformes β -tripeptoides *O*- et *S*-glycosylées

Dans ce chapitre, nous commencerons par faire une mise au point bibliographique sur des composés peptidomimétiques que sont les peptoides. Nous parlerons plus particulièrement des α -peptoides et des β -peptoides. Nous décrirons successivement leurs méthodes de synthèse (sur support solide ou en solution) ainsi que certaines de leurs préférences conformationnelles. Nous montrerons que la synthèse rapide et efficace des peptoides, la possibilité de fonctionnaliser leurs chaînes latérales de différentes manières ainsi que leurs propriétés pharmacologiques, nous permettent d'envisager de les employer comme plateformes présentatrices de pharmacophores.

Parmi ces pharmacophores, il en existe de nature saccharidique. Ceci nous permettra alors d'introduire le concept de glycopeptide (α et β) dont les premières synthèses datent de 1995. Nous présenterons, entre autre, la synthèse de peptoides modèles portant un ou plusieurs sucres grâce à des liaisons O-glycosidiques, N-glycosidiques ou C-glycosidiques. Nous décrirons également, la synthèse des composés S-glycoconjugués qui sont de bons analogues des composés O-glycoconjugués naturels.

Lors de ma thèse, nous nous sommes intéressés plus précisément aux β -glycopeptides, peu référencés dans la littérature. Nous avons développé la synthèse de plateformes β -tripeptoides O- et S-glycosylées dont les unités saccharidiques sont la N-acétylgalactosamine (GalNAc) mais également le mannose. Les plateformes mannosylées nous ont permis d'optimiser les méthodes de synthèse choisies.

I. Etude bibliographique sur les peptoides

A. Découverte et intérêt des peptoides

Parmi les peptidomimétiques décrits dans la littérature, nous pouvons citer les β -peptides,¹³⁴ les γ -peptides,¹³⁵ les aza- β^3 -peptides¹³⁶ et les oligourées¹³⁷ mais également d'autres composés présentant un intérêt considérable depuis quelques années comme les peptoides (Figure 2.1).

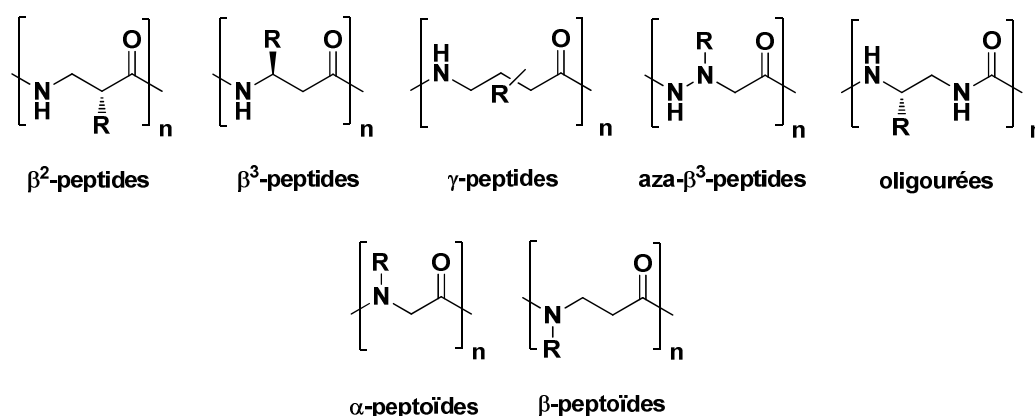


Figure 2.1: Exemples de squelettes peptidomimétiques.

1. Les α -peptoides

Les α -peptoides, oligomères de glycines *N*-substituées, sont des analogues de peptides dont la chaîne latérale est déplacée du carbone α sur l'atome d'azote du lien amide.^{138,139} Ils ont été décrits pour la première fois par R. Zuckermann en 1992.¹⁴⁰ Les premiers oligomères peptoides

¹³⁴ Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews, J. L.; Schreiber, J. V.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. β^2 - and β^3 -Peptides with Proteinaceous Side Chains: Synthesis and solution structures of constitutional isomers, a novel helical secondary structure and the influence of solvation and hydrophobic interactions on folding. *Helvetica Chimica Acta* **1998**, 2015-2022.

¹³⁵ Guichard, G.; Huc, I. Synthetic foldamers. *Chemical Communications* **2011**, 47, 5933-5941.

¹³⁶ Salaün, A.; Potel, M.; Roisnel, T.; Gall, P.; Le Grel, P. Crystal Structures of Aza- β^3 -peptides, A New Class of Foldamers Relying on a Framework of Hydrazinoturns. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 3367-3379.

¹³⁷ Semetey, V.; Rognan, D.; Hemmerlin, C.; Graff, R.; Briand, J.; Marraud, M.; Guichard, G. Stable Helical Secondary Structure in Short - Chain N,N' - Linked Oligoureas Bearing Proteinogenic Side Chains. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, 1893-1895.

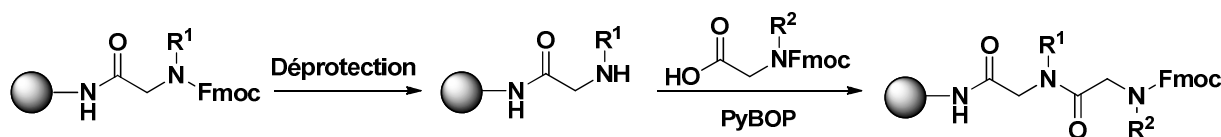
¹³⁸ Zuckermann, R. N. Peptoid Origins. *Biopolymers* **2011**, 96, 545-555.

¹³⁹ Yoo, B.; Kirshenbaum, K. Peptoid architectures: elaboration, actuation, and application. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, 12, 714-721.

¹⁴⁰ Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, 89, 9367-9371.

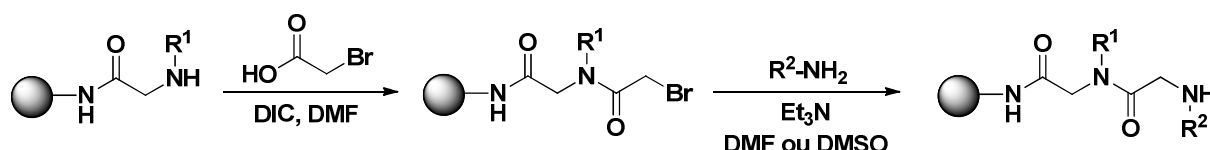
longs d'une dizaine de résidus ont été synthétisés sur support solide de manière analogue à la synthèse des peptides en protégeant les monomères par un groupement Fmoc (Schéma 2.1A).

A. Synthèse par couplage de monomères



B. Synthèse par la méthode submonomère

i) Synthèse supportée



ii) Synthèse en solution

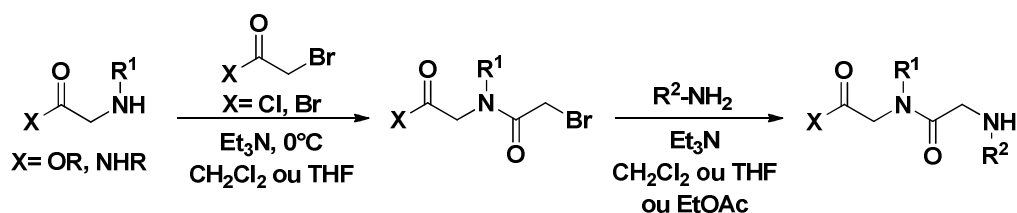


Schéma 2.1: Les principales méthodes d'accès aux α -peptoides sur support et en solution.

L'encombrement stérique de l'amine secondaire rend le couplage plus difficile. L'emploi de l'agent de couplage PyBop permet alors d'obtenir des résultats satisfaisants. Avec cette méthode, il est possible de former des banques de peptoides par chimie combinatoire. Néanmoins, ceci nécessite la préparation préalable de quantités importantes de monomères, ce qui est très coûteux en temps.

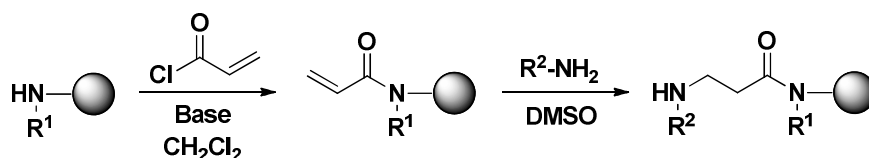
Les mêmes auteurs ont alors rapidement mis en place une méthode plus efficace de synthèse supportée, adaptée aux peptoides. Ils l'ont appelée "Submonomer solid phase synthesis of peptoids" ou méthode submonomère (Schéma 2.1Bi). C'est une méthode itérative en deux étapes. Une première étape permet la synthèse du squelette par couplage au DIC de l'acide bromoacétique avec l'extrémité N-terminale de l'oligomère portée par la résine. Une seconde étape de substitution nucléophile du bromoacétamide intermédiaire par une amine primaire permet d'introduire la chaîne latérale. Ces deux étapes sont répétées en faisant varier les amines primaires. Grâce à cette méthode, des peptoides allant jusqu'à une cinquantaine de résidus ont été

synthétisés.¹⁴¹ La variation des amines apporte une grande diversité structurale aux α -peptoides. Certains travaux ont montré que les deux étapes de la méthode submonomère pouvaient être activées par irradiation micro-ondes.¹⁴² Ce mode d'activation augmente l'efficacité du couplage d'amines stériquement encombrées ou électroniquement désactivées. La méthode submonomère est également adaptée à la synthèse en solution d'oligomères de longueur inférieure à 10 résidus à l'échelle du gramme. En solution, la première étape est une acylation de l'amine par le chlorure ou le bromure de bromoacétyle (Schéma 2.1Bii).¹⁴³

2. Les β -peptoides

Ce sont des homologues d' α -peptoides et sont définis comme des oligomères de β -alanines *N*-substituées.¹⁴⁴ Ils ont été décrits pour la première fois par Hamper et al. en 1998.¹⁴⁵ La méthode submonomère a été adaptée à leur synthèse et présente les mêmes avantages (Schéma 2.2A). C'est aussi une méthode itérative en deux étapes: le squelette du β -peptuide est formé par acylation avec le chlorure d'acryloyle puis la chaîne latérale est introduite par une réaction d'aza-Michael d'une amine primaire sur l'intermédiaire acrylamide.

A. Synthèse supportée



B. Synthèse en solution

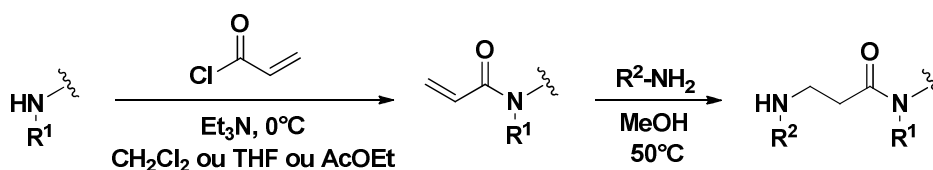


Schéma 2.2: Synthèse des β -peptoides par la méthode submonomère. A) Supportée; B) En solution.

¹⁴¹ Culf, A. S.; Ouellette, R. J. Solid-Phase Synthesis of *N*-Substituted Glycine Oligomers (α - Peptoids) and Derivatives. *Molecules* **2010**, *15*, 5282-5335.

¹⁴² Olivos, H. J.; Alluri, P. G.; Reddy, M. M.; Salony, D.; Kodadek, T. Microwave-Assisted Solid-Phase Synthesis of Peptoids. *Organic Letters* **2002**, *4*, 4057-4059.

¹⁴³ Hjelmgaard, T.; Faure, S.; Caumes, C.; De Santis, E.; Edwards, A. A.; Taillefumier, C. Convenient Solution-Phase Synthesis and Conformational Studies of Novel Linear and Cyclic α,β -Alternating Peptoids. *Organic Letters* **2009**, *11*, 4100-4103.

¹⁴⁴ Olsen, C. A. β -Peptoid "Foldamers" – Why the Additional Methylene Unit? *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96*, 561-566.

¹⁴⁵ Hamper, B. C.; Kolodziej, S. A.; Scates, A. M.; Smith, R. G.; Cortez, E. Solid Phase Synthesis of β -Peptoids: *N*-Substituted β -Aminopropionic Acid Oligomers. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 708-718.

Les conditions de synthèse supportée des β -peptoides ont été beaucoup moins étudiées et optimisées que celles des α -peptoides. A l'heure actuelle elles ne permettent pas la synthèse de longs oligomères avec une pureté et un rendement suffisants. Pour remédier à ce problème, Shuey et al. ont utilisé une approche supportée par couplage de blocs (dimères ou trimères β -peptoides).¹⁴⁶ Des oligomères longs de 18 unités ont ainsi pu être obtenus. Récemment, une méthode monomère supportée a été exploitée pour la préparation d'un 16-mère en utilisant DIC/HOBt¹⁴⁷ comme agent de couplage. Par ailleurs, une optimisation des conditions réactionnelles en solution ainsi que l'utilisation d'amines primaires volatiles ont permis la préparation de tétramères à l'échelle du gramme en 7 étapes sans purification chromatographique intermédiaire (réalisée dans le laboratoire - Schéma 2.3).¹⁴⁸ La présence d'alcènes, d'alcynes ou d'amines tertiaires portés par les chaînes latérales du squelette peptoidique, permet l'introduction d'une grande diversité structurale par post-modification.

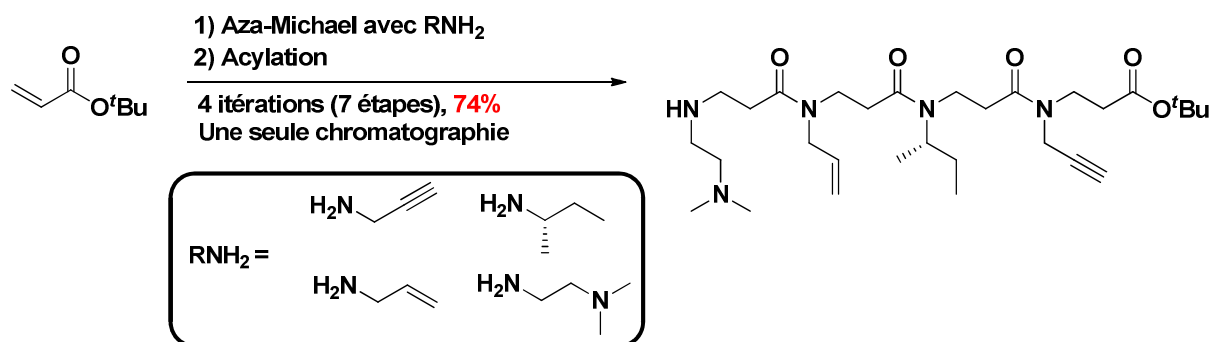


Schéma 2.3: β -térapeptide obtenu par la méthode submonomère en solution en utilisant des amines volatiles.

¹⁴⁶ Shuey, S. W.; Delaney, W. J.; Shah, M. C.; Scialdone, M. A. Antimicrobial [β]-peptoids by a block synthesis approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, 1245-1248.

¹⁴⁷ Jahnsen, R. D.; Frimodt-Møller, N.; Franzyk, H. Antimicrobial Activity of Peptidomimetics against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*: A Comparative Study of Different Backbones. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 7253-7261.

¹⁴⁸ Caumes, C.; Hjelmgård, T.; Remuson, R.; Faure, S.; Taillefumier, C. Highly Convenient Gram-Scale Solution-Phase Peptoid Synthesis and Orthogonal Side-Chain Post-Modification. *Synthesis* **2011**, 2, 257-264.

3. Autres composés apparentés

En plus des α - et des β -peptoides, il existe d'autres analogues:¹⁴⁹ les α,β -peptoides,¹⁴³ les arylopeptoides,¹⁵⁰ les azapeptoides,¹⁵¹ les N-hydroxy-peptoides¹⁵² et les N-alcoxy-peptoides.¹⁵³ Ils sont le plus souvent obtenus par la méthode submonomère (Figure 2.2).

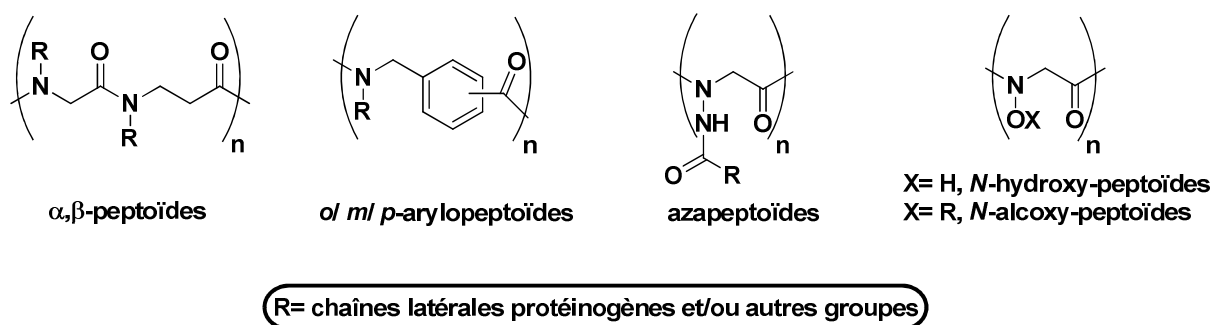


Figure 2.2: Architectures des autres familles de composés apparentés aux peptoides.

B. Aspect structural

La modification structurale qui conduit aux peptoides (déplacement des chaînes latérales du carbone α vers l'azote du lien amide) a plusieurs conséquences immédiates:

- L'absence de chiralité du squelette.
- La capacité réduite à former des liaisons hydrogènes (due à la disparition des NH d'amides secondaires).
- La N-substitution des amides crée des amides N,N-disubstitués, ce qui facilitera la présence de liaisons peptidiques *cis* et *trans* (Figure 2.3A). Les peptoides ont alors une grande liberté conformationnelle. Ainsi en solution, un peptuide constitué de n monomères peut exister comme un mélange équilibré de 2^{n-1} isomères. Son spectre RMN

¹⁴⁹ Szekely, T.; Caumes, C.; Roy, O.; Faure, S.; Taillefumier, C. α -Peptoids and related compounds: Synthesis and control of the conformation. *Comptes Rendu Chimie* **2013**, *16*, 318-330.

¹⁵⁰ Hjelmgard, T.; Faure, S.; Staerk, D.; Taillefumier, C.; Nielsen, J. Expedient Solution-Phase Synthesis and NMR Studies of Arylopeptoids. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, *17*, 4121-4132.

¹⁵¹ Aubin, S.; Martin, B.; Delcros, J.; Arlot-Bonnemains, Y.; Baudy-Floc'h, M. Retro Hydrazino-azapeptoids as Peptidomimetics of Proteasome Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 330-334.

¹⁵² Crapster, J. A.; Stringer, J. R.; Guzei, I. A.; Blackwell, H. E. Design and conformational analysis of peptoids containing N-hydroxy amides reveals a unique sheet-like secondary structure. *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96*, 604-616.

¹⁵³ Jordan, P. A.; Paul, B.; Butterfoss, G. L.; Renfrew, P. D.; Bonneau, R.; Kirshenbaum, K. Oligo(N-alcoxy glycines): Trans substantiating peptoid conformations. *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96*, 617-626.

est donc en général une combinaison de différents rotamères, ce qui rend son étude plus complexe.

- La nécessité de construire une chaîne peptoïde positionnée en sens inverse par rapport à celle du peptide qu'il mime, afin de conserver une grande similarité entre les deux structures. A cet effet, les carbonyles et les chaînes latérales du peptoïde correspondent à celles du peptide parent (Figure 2.3B).

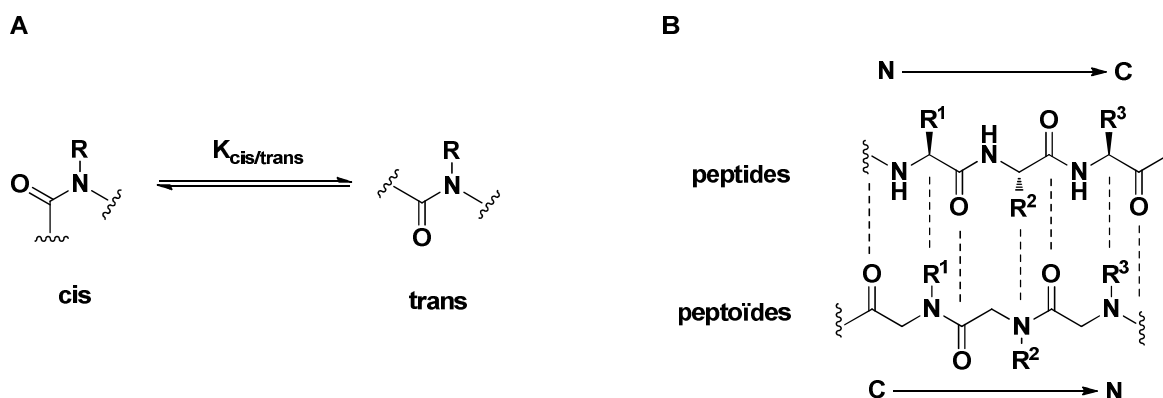


Figure 2.3: Caractéristiques structurales des peptoïdes.

A) Equilibre *cis/trans* du lien amide; B) Sens inversé des chaînes peptidiques et peptidiques.

Malgré une flexibilité conformationnelle importante, les peptoides sont capables d'adopter des structures secondaires bien définies. La conformation hélicoïdale de type polyproline I (PPI, amides tout *cis*)¹⁵⁴ est la conformation préférentiellement adoptée par les α -peptoides qui portent des chaînes latérales C α branchées (Figure 2.4). Bien souvent une hétérogénéité conformationnelle (isomérisation *cis/trans* des amides) est observée. Diverses stratégies¹⁵⁵ ont été développées consistant en l'introduction de chaînes latérales engendrant l'apparition d'effets stériques^{156,157}, d'effets électroniques¹⁵⁸ ou le rétablissement de liaisons hydrogènes entre le carbonyle du squelette et les chaînes latérales.¹⁵⁵ La structure de type polyproline II (PPII), dont

¹⁵⁴ Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Falicov, A.; Dunbrack Jr, R. L.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Cohen, F. E. Chiral N-substituted glycines can form stable helical conformations. *Folding and Design*. **1997**, 2, 369-375.

¹⁵⁵ Gorske, B. C.; Stringer, J. R.; Bastian, B. L.; Fowler, S. A.; Balckwell, H. E. New Strategies for the Design of Folded Peptides Revealed by a Survey of Noncovalent Interactions in Model Systems. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 16555-16567.

¹⁵⁶ Roy, O.; Caumes, C.; Esvan, Y.; Didierjean, C.; Faure, S.; Taillefumier, C. The tert-Butyl Side Chain: A Powerful Means to Lock Peptoid Amide Bonds in the Cis Conformation. *Organic Letters* **2013**, *15*, 2246-2249.

¹⁵⁷ Stringer, J. R.; Crapster, J. A.; Guzei, I. A.; Blackwell, H. E. Extraordinarily Robust Polyproline Type I Peptoid Helices Generated via the Incorporation of α -Chiral Aromatic N-1-Naphthylethyl Side Chains. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 15559-15567.

¹⁵⁸ Caumes, C.; Roy, O.; Faure, S.; Taillefumier, C. The Click Triazolium Peptoid Side Chain: A Strong *cis*-Amide Inducer Enabling Chemical Diversity. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 9553-9556.

tous les liens amides sont *trans* est néanmoins rencontrée dans le cas d'homo-oligomères constitués d'unités N-(aryl)glycines.¹⁵⁹

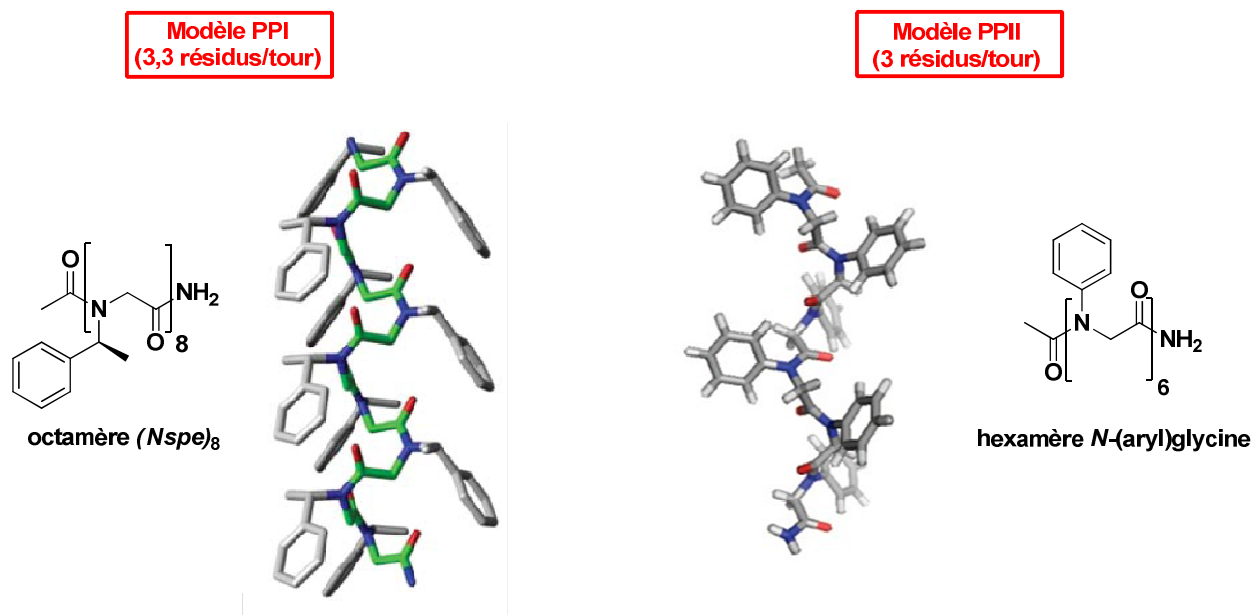


Figure 2.4: Structure des PPI¹⁵⁴ et PPII¹⁵⁹ calculées par modélisation moléculaire.

Dans le cas des β -peptoides et des α,β -peptoides, les études se sont essentiellement limitées à des analyses par dichroïsme circulaire. A ce jour, seule la conformation de composés cycliques a pu être déterminée. Les premiers β -peptoides cycliques ont été préparés au laboratoire en 2008 et un tétramère β -peptotide cyclique présentant quatre chaînes propargyles a pu être cristallisé (Figure 2.5).¹⁶⁰ Il possède une structure rigide symétrique présentant uniquement des liaisons amide *cis*.

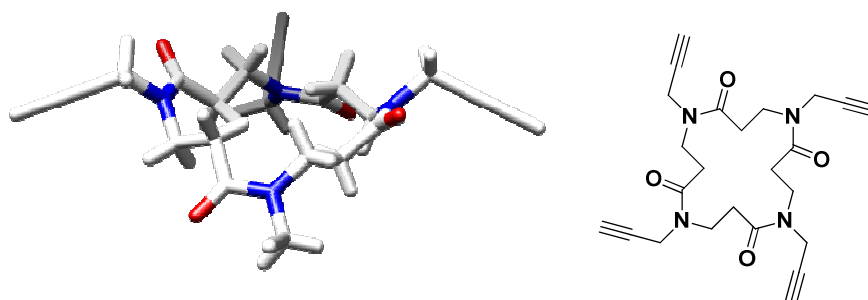


Figure 2.5: Structure RX d'un tétramère cyclique β -peptotide.

¹⁵⁹ Shah, N. H.; Butterfoss, G. L.; Nguyen, K.; Yoo, B.; Bonneau, R.; Rabenstein, D. L.; Kirshenbaum, K. Oligo(N-aryl glycines): A new twist on structured peptoids. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 16622-16632.

¹⁶⁰ Roy, O.; Faure, S.; Thery, V.; Didierjean, C.; Taillefumier, C. Cyclic β -peptoids. *Organic letters* **2008**, *10*, 921-924.

Un octamère cyclique de squelette α,β -peptoïde a également été analysé par diffraction des rayons X (Figure 2.6).¹⁶¹ Le macrocycle cristallin peut être considéré comme un rectangle vrillé. Il est constitué de quatre liaisons *trans* et de quatre liaisons *cis* alternées par paires.

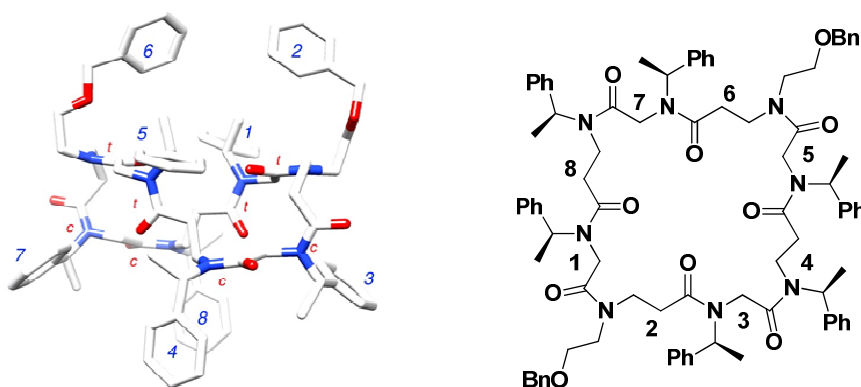


Figure 2.6: Structure RX d'un l'octamère cyclique α,β -peptoïde.

C. Applications des peptoides

L'intérêt des peptoides repose sur leur facilité de synthèse et la très grande diversité possible en termes de chaînes latérales. Des travaux récents se sont orientés dans le domaine des biomatériaux¹⁶² mais à ce jour ils ont été essentiellement utilisés comme peptidomimétiques (peptoides amphiphiles antibactériens, surfactants pulmonaires,...)¹⁶³ en raison de leur grande stabilité métabolique aux protéases,¹⁶⁴ de leur meilleure perméabilité membranaire que les peptides¹⁶⁵ et de leur caractère non immunogène.¹⁶⁶

¹⁶¹ Santis, E.; Hjelmgaard, T.; Faure, S.; Roy, O.; Didierjean, C.; Alexander, B. D.; Siligardi, G.; Hussain, R.; Jávorfí, T.; Edwards, A. A.; Taillefumier, C. Cyclic α,β -peptoids octamers with differing side chain patterns: synthesis and conformational investigation. *Amino Acids* **2011**, *41*, 663-672.

¹⁶² Kudirka, R.; Tran, H.; Sanii, B.; Tae Nam, K.; Choi, P. H.; Venkateswaran, N.; Chen, R.; Whitlam, S.; Zuckermann, R. N. Folding of a single-chain, information-rich polypeptoid sequence into a highly ordered nanosheet. *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96*, 586-595.

¹⁶³ Zuckermann, R. N.; Kadodek, T. Peptoids as potential therapeutics. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **2009**, *11*, 299-307.

¹⁶⁴ Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. Proteolytic studies of homologous peptide and N-substituted glycine peptoid oligomers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 2657-2662.

¹⁶⁵ Schröder, T.; Quintilla, A.; Setzler, J.; Birtalan, E.; Wenzel, W.; Bräse, S. Joint experimental and theoretical investigation of the propensity of peptoids as drug carriers. *WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine* **2007**, *4*, 145-148.

¹⁶⁶ Astle, J. M.; Udugamasooriya, D. G.; Smallshaw, J. E.; Kodadek, T. A VEGFR2 antagonist and other peptoids evade immune recognition. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2008**, *14*, 223-227.

A l'instar des calixarènes ou des plateformes peptidiques cycliques de type RAFT,¹⁶⁷ toutes ces propriétés décrites ci-dessus nous autorise donc à envisager d'utiliser le squelette des peptoides comme plateforme présentatrice de groupements pharmacophores, et notamment de sucres antigéniques.

II. Etude bibliographique sur les glycopeptoides

A. Des glycopeptides aux glycopeptoides

Le concept de "glycopeptoides" a été introduit pour la première fois en 1995 par l'équipe de René Roy.¹⁶⁸ Il est actuellement employé dans de nombreux cas associés à des structures différentes (Figure 2.7). Le premier cas correspond à la conversion complète d'un glycopeptide en son homologue glycopeptotide (Figure 2.7A). Un autre cas correspond au remplacement seulement des sites de glycosylation du peptide par des monomères glycopeptoides entraînant la formation de structures hybrides appelées "glycopeptomères" (Figure 2.7B).¹⁶⁹ Enfin, les peptoides peuvent servir de plateformes pour préparer des glycoligands multivalents utilisés lors de l'élaboration d'édifices plus complexes (Figure 2.7C).

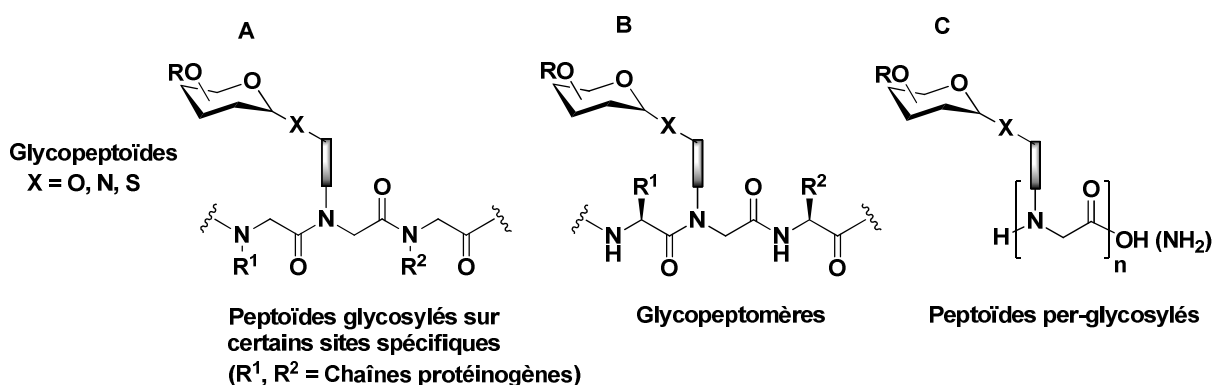


Figure 2.7: Diverses structures de glycopeptoides.

¹⁶⁷ Plé, S.; Figuet, M.; Dumy, P. Template-directed combinatorial surface assembly for protein-protein interaction mimetics. *Comptes Rendus Chimie* **2005**, 8, 833-839.

¹⁶⁸ Saha, U. K.; Roy, R. First Synthesis of N-Linked-Glycopeptoid as New Glycopeptidomimetics. *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, 3635-3638.

¹⁶⁹ Szekely, T.; Roy, O.; Faure, S.; Taillefumier, C. From Glycopeptides to Glycopeptoids. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, 5671-5657.

Les deux premières situations sont liées principalement à la recherche et au développement de composés glycopeptidomimétiques alors que la dernière se réfère au développement de nouveaux glyoclusters, importants pour la compréhension des interactions sucres-protéines.¹⁷⁰

La conjugaison des sucres aux peptides et aux protéines intervient naturellement suivant différents types de liens glycosidiques (principalement *N*- et *O*-glycosylations). La *N*-glycosylation au niveau de la chaîne latérale carboxamide du résidu asparagine (Asn) est l'un des événements le plus fréquemment retrouvé. Un résidu β -*N*-glycosyl-Asn et son mime structurel β -*N*Asn glycine sont décrits sur la Figure 2.8. La *O*-glycosylation est une modification post-traductionnelle qui apparaît principalement au niveau des chaînes latérales des acides aminés sérine (Ser) et thréonine (Thr). La conversion des résidus Ser et Thr glycosylés en unités peptoides requiert l'emploi de chaînes latérales homologues *Mh*Ser et *Mh*Thr et non *N*Ser et *N*Thr puisque ces dernières conduisent à la formation de composés *N,O*-cétals instables chimiquement.

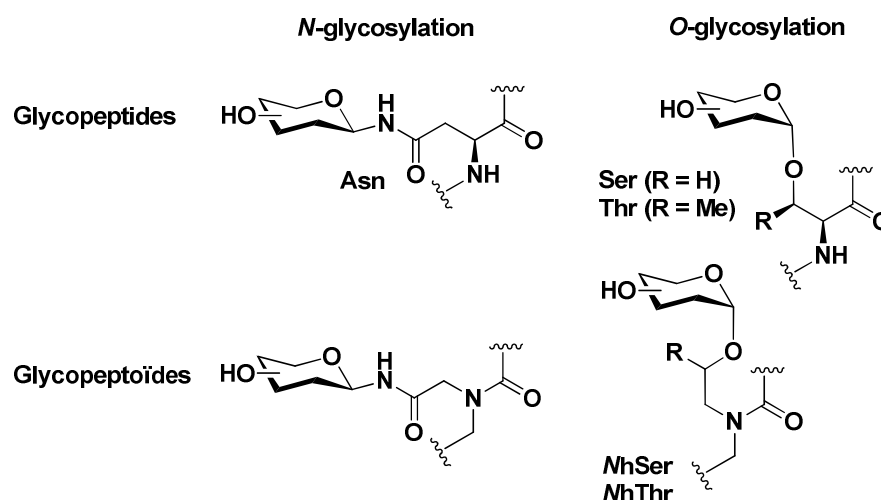


Figure 2.8: Représentation des *N*- et *O*-glycosylations au niveau des peptides et peptoides.

B. Synthèse de composés glycopeptidomimétiques

Nous avons récemment publié une revue¹⁶⁹ décrivant la synthèse des glycopeptoides ainsi que leurs applications. Dans la partie qui suit, nous allons décrire les exemples les plus marquants.

¹⁷⁰ Roy, R. Recent Developments in the Rational Design of Multivalent Glycoconjugates. *Topics in Current Chemistry* **1997**, 187, 241-274.

1. Glycopeptoïdes N-liés

Le premier modèle proposé par R. Roy est un pentapeptoïde asparagine N-acétylglucosaminide **2.5**, préparé en solution (Schéma 2.4).¹⁶⁸ Afin d'obtenir cet oligomère, une stratégie convergente incluant une approche submonomère combinée à une approche monomère (couplage de différents fragments peptoides), a été utilisée. L'amine glycosylée **2.2** est synthétisée à partir de l'azoture de glycosyl **2.1**, décrit dans la littérature. Celle-ci est ensuite employée dans une approche submonomère pour former le dipeptoïde glycosylé **2.3** en trois étapes en partant du bromoacétate de *tert*-butyle. L'élongation de la chaîne est accomplie par couplage peptidique en présence de l'acide carboxylique **2.4** synthétisé initialement à l'aide de la méthode submonomère. Après cela, la chaîne latérale de la lysine ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}\text{Boc}$) est introduite par substitution du brome terminal et un dernier résidu *N*-méthylglycine (sarcosine) est incorporé par couplage peptidique en présence de *N*-acétylsarcosine. Au final, l'ensemble des protections sont éliminées afin d'obtenir le glycopeptoïde attendu.

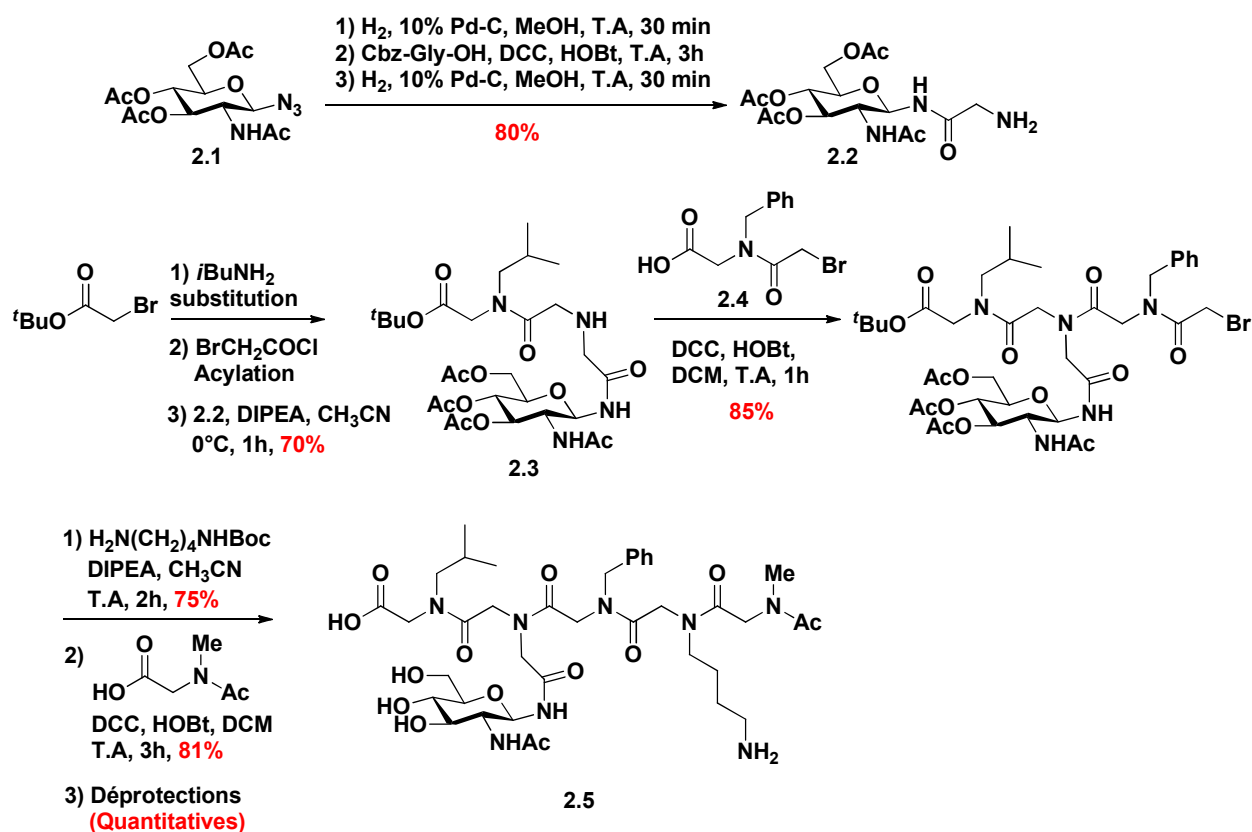


Schéma 2.4: Synthèse du premier peptoïde N-glycosylé **2.5**.

Ces travaux ont été poursuivis par la synthèse de composés α -peptoides N-glycosylés, analogues de la séquence Leu¹⁶⁵-Asn-Phe-Pro-Ile¹⁶⁹, présente au sein du substrat naturel

(polyprotéine *gal-pol*) de l'aspartyle protéase HIV-1.¹⁷¹ La synthèse de l'analogue **2.6** (Figure 2.9A) dont la chaîne latérale de l'asparagine est glycosylée par un résidu *N*-acétylglucosamine, repose sur une combinaison des approches submonomère et monomère. L'activité inhibitrice envers la protéase HIV-1 de ce composé s'est, malheureusement, révélée très faible.

Un second modèle d' α -glycopeptide *N*-lié **2.7** (Figure 2.9B), également décrit par le groupe de R. Roy, est caractérisé par une séquence hexamérique portant un groupement lactosyle: Ac-NMet-NGlu-NAsn(Lactose)-NHser-NHTyr-NVal.¹⁷² Ce glycopeptide a été élaboré à l'aide d'une méthode convergente en solution presque identique à celle mentionnée ci-dessus.

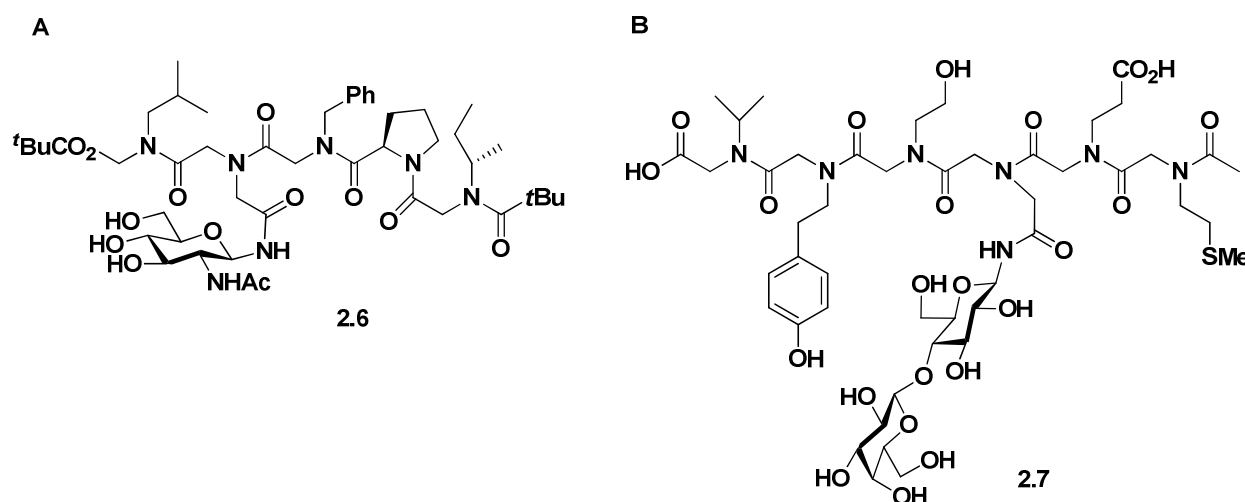


Figure 2.9: Autres exemples d' α -peptoides *N*-glycosylés.

A) Analogue de la séquence Leu¹⁶⁵-Asn-Phe-Pro-Ile¹⁶⁹; B) α -glycopeptide *N*-lactosylé.

2. Glycopeptoides O-liés

Le premier exemple de peptotide *O*-glycosylé a également été proposé par R. Roy. Pour ce faire, la séquence Val-Phe-Ser-(β -D-Xyl)-Glu-Ala correspondant à une partie des protéoglycanes présents au niveau des os humains et du cartilage a été choisie comme prototype. Le rétro-xylopeptide NAla-NGlu-NHser(β -D-Xyl)-NPhe-NVal (**2.10**, Schéma 2.5) a été synthétisé par couplage peptidique entre deux fragments peptoides en utilisant le DCC, suivi d'une élimination de l'ensemble des différents groupements protecteurs.¹⁷³

¹⁷¹ Saha, U.; Roy, R. Glycosylated Peptoids as Prototypical HIV-1 Protease Inhibitors. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, 7697-7700.

¹⁷² Saha, U.; Roy, R. Synthesis of New Glycopeptidomimetics Based on *N*-Substituted Oligoglycine bearing an *N*-Linked Lactoside Side-chain. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, 2571-2573.

¹⁷³ Kim, J. M.; Roy, R. New prototypical O-linked-glycopeptidomimetics corresponding to the linkage region of proteoglycans. *Carbohydrate Research*, **1997**, 298, 173-179.

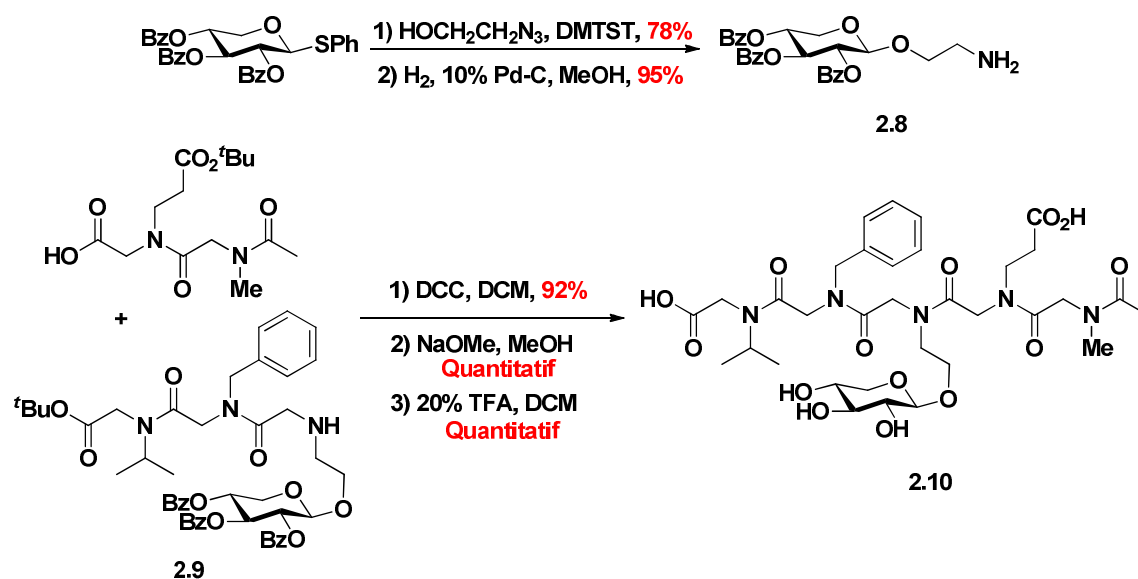


Schéma 2.5: Synthèse du rétro-xylopeptotide.

Le fragment glycopeptide **2.9** a été élaboré, initialement, par la méthode itérative submonomère comprenant deux étapes (*N*-alkylation/*N*-bromoacétylation) à partir du bromoacétate de *tert*-butyle et en employant successivement *i*PrNH₂, BnNH₂, ainsi que le 2-aminoéthyl β -D-xylopyranoside **2.8** qui mime l'homosérine glycosylée.

Shin et Bang¹⁷⁴ ont, de leur côté, étudié l'intérêt de la substitution d'un résidu GalNAc- α -O-Thr¹¹ de la drosocine, par différents résidus peptoides *O*-glycosylés. La drosocine est un peptide cationique anti-microbien, riche en proline et isolé de *Drosophila melanogaster*. Elle présente une faible toxicité envers les érythrocytes humains ainsi qu'une grande spécificité envers les bactéries à Gram négatif. Certaines découvertes ont prouvé que la glycosylation de Thr¹¹ jouait un rôle primordial dans l'activité anti-bactérienne de la drosocine et que la substitution de l'acide aminé Ser⁷ par Thr⁷ augmentait considérablement la stabilité de ces analogues. Forts de cela, les auteurs ont alors proposé une série de nouveaux analogues glycopeptoides comme celui représenté sur la figure 2.10. La substitution du résidu naturel GalNAc- α -O-Thr par un résidu peptide *O*-glycosylé favorise la stabilité de la liaison sucre-peptide. Cet analogue de 19 résidus est obtenu par synthèse supportée sur une résine H-Val-Wang en utilisant un monomère glycopeptide. Par rapport à la drosocine, l'analogue modifié au niveau de Thr¹¹ a montré une plus forte activité anti-bactérienne.

¹⁷⁴ Ahn, M.; Murugan, R. N.; Nan, Y. H.; Cheong, C.; Sohn, H.; Kim, E.-H.; Hwang, E.; Ryu, E. K.; Kang, S. W.; Shin, S. Y.; Bang, J. K. Substitution of the GalNAc- α -O-Thr¹¹ residue in drosocin with *O*-linked glyco-peptoid residue: Effect on antibacterial activity and conformational change. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21, 6148-6153.

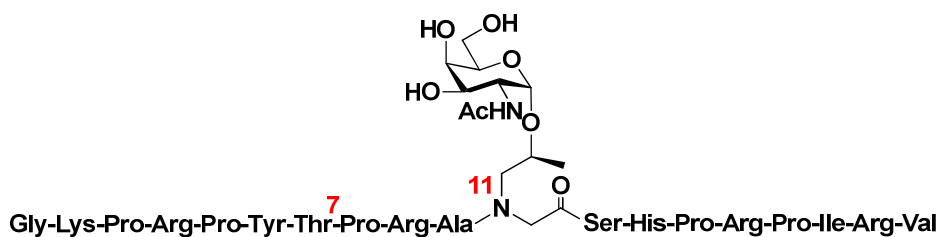


Figure 2.10: Synthèse d'un analogue glycopeptoidique de la drosocine.

La métathèse croisée entre des peptoides *N*-alcényles et une variété de glycosides *O*-allyles protégés est une méthode qui a également permis d'accéder aux peptoides *O*-glycosylés.¹⁷⁵ Dans cette étude préliminaire, la réaction est effectuée entre des dimères glycines mono *N*-allyles, *N*-butényles et *N*-pentényles et des glycosides *O*-allyles en utilisant le catalyseur de Grubbs (Cy₃P)₂Cl₂Ru=CHPh. Néanmoins, deux inconvénients ont été répertoriés: la faible réactivité des peptoides ayant de courtes chaînes latérales (*N*-allyles et *N*-butényles) et la présence de sous-produits résultant d'auto-métathèses entre les dérivés peptoides d'un côté et les dérivés glycosides de l'autre. Un autre exemple de métathèse croisée oléfinique a été établi par l'équipe de Kwon et al.¹⁷⁶ en 2012. Cette fois-ci, les réactions de métathèse croisée ont été appliquées sur support solide.

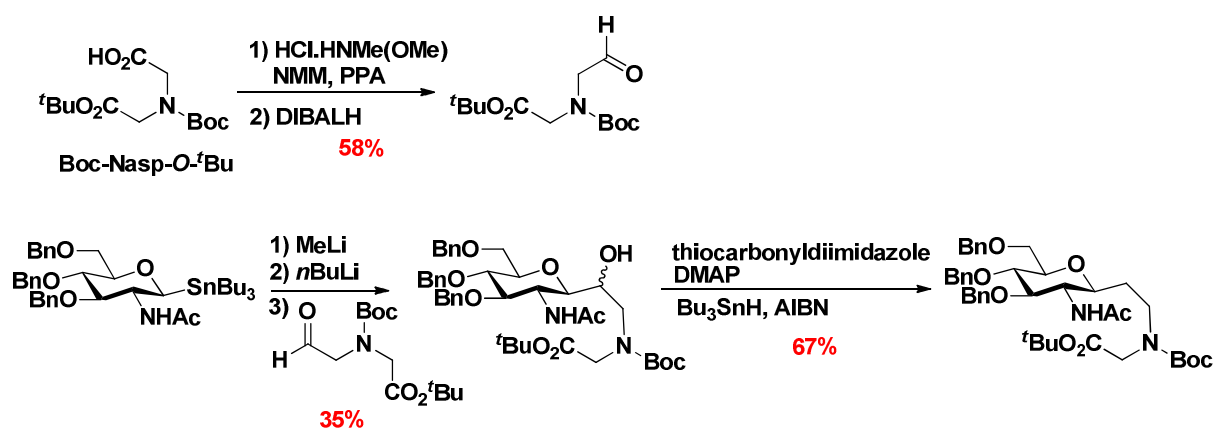
3. Glycopeptoides C-liés

La substitution de la liaison *O*-glycosidique par la liaison *C*-glycosidique présente, dans le cas des peptoides, deux avantages: une résistance accrue à l'hydrolyse enzymatique ainsi que la possibilité de conserver une longueur d'espaceur entre le sucre et le squelette peptide identique à celle observée naturellement au niveau des sérines (ou thréonines) *O*-glycosylées. Fort de ces considérations, le groupe de Kessler a synthétisé le premier α -peptide *C*-glycosylé, analogue du résidu Ser-*O*-GlcNAc (Schéma 2.6).¹⁷⁷

¹⁷⁵ Hu, Y-J.; Roy, R. Cross-Metathesis of *N*-Alkenyl Peptoids with *O*- or *C*-Allyl Glycosides. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 3305-3308.

¹⁷⁶ Khan, S. N.; Kim, A.; Grubbs, R. H.; Kwon, Y-U. Cross Metathesis Assisted Solid-Phase Synthesis of Glycopeptoids. *Organic Letters* **2012**, *14*, 2952-2955.

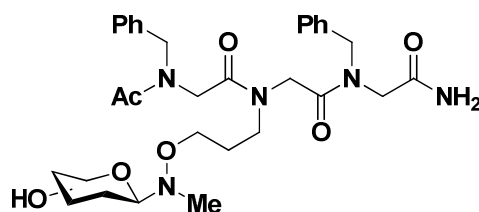
¹⁷⁷ Dechantsreiter, M. A.; Burkhart, F.; Kessler, H. A Stereoselective Synthesis of a *C*-Glycosylated Peptoid Building Block. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 253-254.

Schéma 2.6: Synthèse du peptotide C-glycosylé analogue du résidu Ser-*O*-GlcNAc.

La métathèse croisée entre des glycosides *C*-allyles et des peptoides *N*-alcényles a aussi été réalisée afin de former des peptoides *C*-glycosylés.¹⁷⁵

4. La stratégie *N*-alkylaminooxy

Dumy et Mutter ont mis en oeuvre une autre forme de glycosylation des peptides à l'aide de la stratégie *N*-alkylaminooxy.¹⁷⁸ Celle-ci a été, par la suite, reprise par Carrasco afin d'accéder à des composés glycopeptoides (Figure 2.11).^{179, 180} La stratégie *N*-alkylaminooxy consiste à coupler des lactols non protégés avec des substrats contenant un groupement hydroxylamine *N,O*-disubstituée. La méthode développée est très attrayante puisqu'au contraire des étapes d'amination réductrice des lactols ou de formation d'un lien oxime, la nature cyclique du sucre est préservée.

Figure 2.11: Exemple de glycopeptide obtenu suivant la stratégie *N*-alkylaminooxy.

¹⁷⁸ Peri, F.; Dumy, P.; Mutter, M. Chemo- and Stereoselective Glycosylation of Hydroxylamino Derivatives : A Versatile Approach to Glycoconjugates. *Tetrahedron* **1998**, *5*, 12269-12278.

¹⁷⁹ Carrasco, M. R.; Alvarado, C. I.; Dashner, S. T.; Wong, A. J.; Wong, M. A. Synthesis of Aminoxy and *N*-alkylaminoxy Amines for Use in Bioconjugation. *Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 5757-5759.

¹⁸⁰ Seo, J.; Michaelian, N.; Owens, S. C.; Dashner, S. T.; Wong, A. J.; Barron, A. E.; Carrasco, M. R. Chemoselective and Microwave-Assisted Synthesis of Glycopeptoids. *Organic Letters* **2009**, *11*, 5210-5213.

C. Accès aux plateformes peptoides multivalentes

1. Approches itératives

➤ Synthèses submonomères supportées

Comega et De Riccardis ont décrit la synthèse de composés α -peptoides S-glycosylés multivalents cycliques ou linéaires, par la méthode submonomère sur support solide.¹⁸¹ Leurs travaux incluent l'utilisation de la résine 2-chlorotrityle et d'un ensemble de 2-aminoéthyl thioglycosides (Figure 2.12). Une fois décrochés de la résine, certains composés ont été cyclisés dans le but de générer des structures plus contraintes. L'affinité de ces glycoclusters pour certaines lectines a ensuite été évaluée.

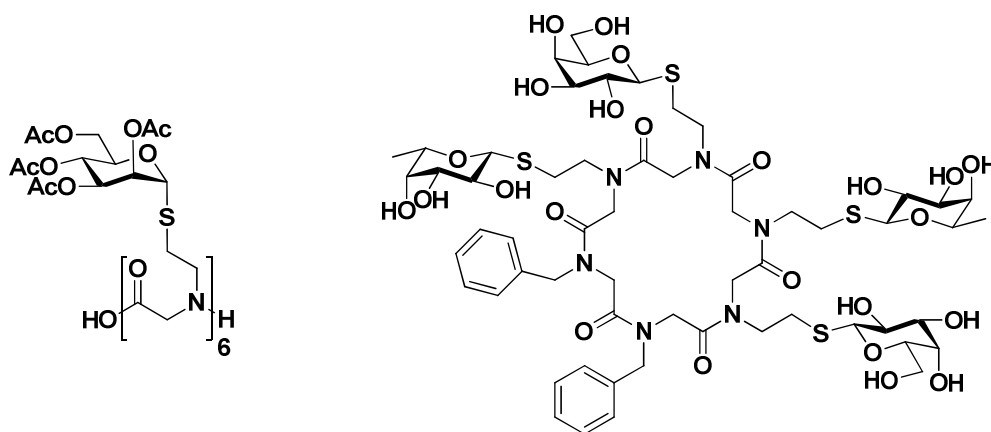


Figure 2.12: Exemples de peptoides S-glycosylés linéaire et cyclique.

Des composés oligopeptoides O-mannosylés (Figure 2.13) ont également été produits sur support solide en utilisant cette fois-ci la résine Rink amide.¹⁸² La synthèse de ces oligopeptoides par la méthode submonomère a nécessité la préparation, au préalable, du 2-aminoéthyl mannoside **2.11**. La particularité de cette synthèse réside dans le fait que ce monomère est employé sans aucun groupement protecteur. Les glycoclusters obtenus ont été par la suite fonctionnalisés de différentes manières (Dansyl, biotine) afin d'évaluer leurs capacités à interagir avec une lectine modèle, la concanavaleine A (ConA). Des tests ELLA ont montré que la

¹⁸¹ Comega, D.; De Riccardis F. An Efficient Modular Approach for the Assembly of S-Linked Glycopeptides. *Organic Letters* **2009**, *11*, 3898-3901.

¹⁸² Yuasa, H.; Kamata, Y.; Kurono, S.; Hashimoto, H. Solid phase synthesis of oligomannopeptides that mimic the concanavaleine A-binding trimannoside. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 2139-2144.

structure pentamérique des oligomannopectoïdes est la taille minimale pour reconnaître efficacement ConA.¹⁸³

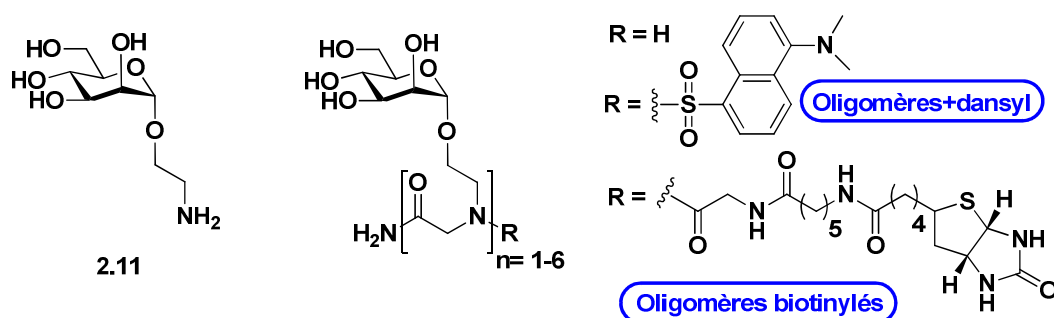


Figure 2.13: Oligopeptoides O-mannosylés testés pour l'interaction avec ConA.

➤ Couplage de monomères en phase solide et en solution

Cette section correspond à la synthèse de glycopeptoides multivalents à partir de monomères glycopeptoides protégés. Roy et coll. ont encore une fois été les pionniers dans ce domaine. Ils ont, entre autre, utilisé le squelette peptoid afin de présenter des mimes de l'antigène Tn (GalNac- α -O-Ser).¹⁸⁴ Ainsi, ils ont réalisé des clusters α -O-GalNac comprenant 2, 3, 4, 6 et 8 unités répétitives en employant la méthode de couplage de fragments où chaque nouveau glycopeptoides obtenu présente le double de la taille de son précurseur (Figure 2.14 - à gauche). Les auteurs ont également synthétisé des glycopeptomères caractérisés par la répétition de modules glycyglycine N-substitués (Figure 2.14 - à droite).¹⁸⁵ L'alternance de monomères glycines protéinogènes et d'unités glycopeptoides augmente la distance entre les groupements lactosyles. De plus, la distance entre les sucres et le squelette peptoides est plus importante que dans le cas des composés O-glycosylés.

¹⁸³ Yuasa, H.; Honma, H.; Hashimoto, H.; Tsunooka, M.; Kojima-Aikawa, K. Pentamer is the minimum structure for oligomannosylpeptoids to bind to concanavalin A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17, 5274-5278.

¹⁸⁴ Kim, J. M.; Roy, R. Oligomeric Glycopeptidomimetics Bearing the Cancer Related T_n-Antigen. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, 3487-3490.

¹⁸⁵ Roy, R.; Saha, U. K. Rational design of multivalent glycoconjugate ligands. Synthesis of libraries of conformationally flexible rotamers of poly-N-linked lactosyl glycines. *Chemical Communications* **1996**, 201-202.

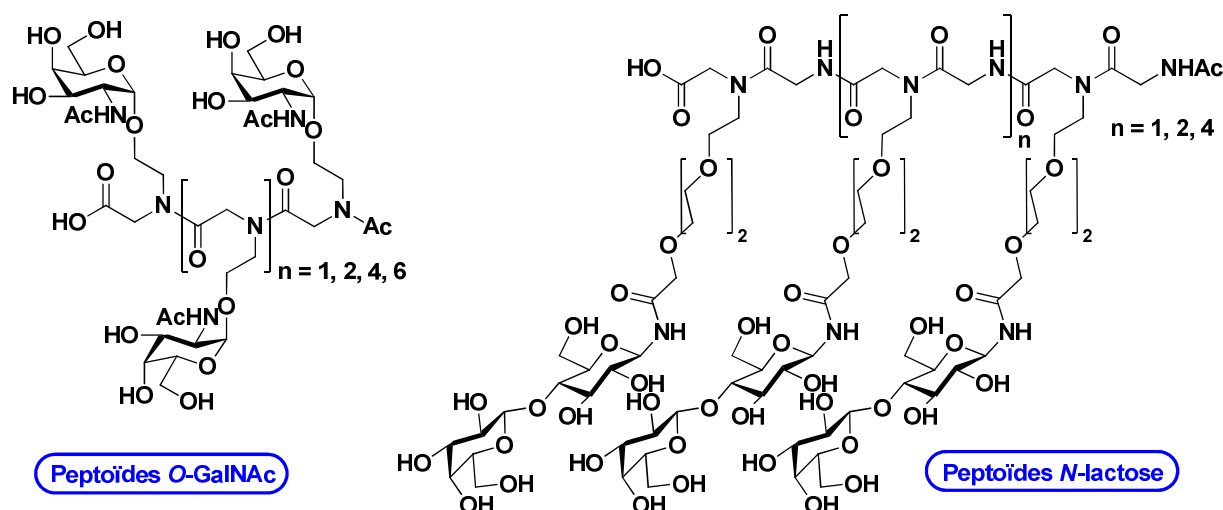


Figure 2.14: Glycopeptoides multivalents synthétisés par Roy et ses collaborateurs

Les glycoprotéines antigel (AFGPs: *Antifreeze Glycoproteins*) jouent un rôle essentiel dans la survie des poissons à des températures négatives. De part leur capacité à inhiber la croissance cristalline, elles ont soulevé un vif intérêt dû à leurs applications potentielles dans différents secteurs tels que la médecine ou l'industrie agro-alimentaire (préservation des aliments). Les AFGPs sont composées d'une répétition d'unités tripeptidiques (Ala-Ala-Thr) au niveau desquelles le groupement hydroxyle des thréonines est lié à un disaccharide β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 3)- α -N-acétyl-D-galactosamine. Parmi ces glycoprotéines, AFGP8 est celle qui présente le plus bas poids moléculaire avec seulement quatre répétitions d'unités tripeptidiques et elle est également caractérisée par la substitution de l'alanine par la proline aux positions 4 et 10. Bang et coll. ont récemment travaillé sur le développement d'analogues des AFGPs présentant une très bonne stabilité. Dans un premier temps, ils ont préparé un cycle glycopeptide cyAFGP^T et une série de cycles glycopeptoides cyAFGP^{1-6} dont ils ont étudié les activités antigel (Figure 2.15).¹⁸⁶ Leurs précurseurs linéaires ont été synthétisés sur support solide avec la résine Fmoc-Ala-Trityl puis ils ont été cyclisés en solution. Aucun des cycles glycopeptoides n'a démontré de capacité à pouvoir inhiber la croissance cristalline au contraire du cycle peptidique CyAFGP^T qui conserve une activité antigel.

¹⁸⁶ Ahn, M.; Murugan, R. N.; Shin, S. Y.; Kim, E.; Lee, J. H.; Kim, H. J.; Bang, J. K. Synthesis of Cyclic Antifreeze Glycopeptide and Glycopeptoids and Their Ice Recrystallization Inhibition Activity. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2012**, 33, 3565-3570.

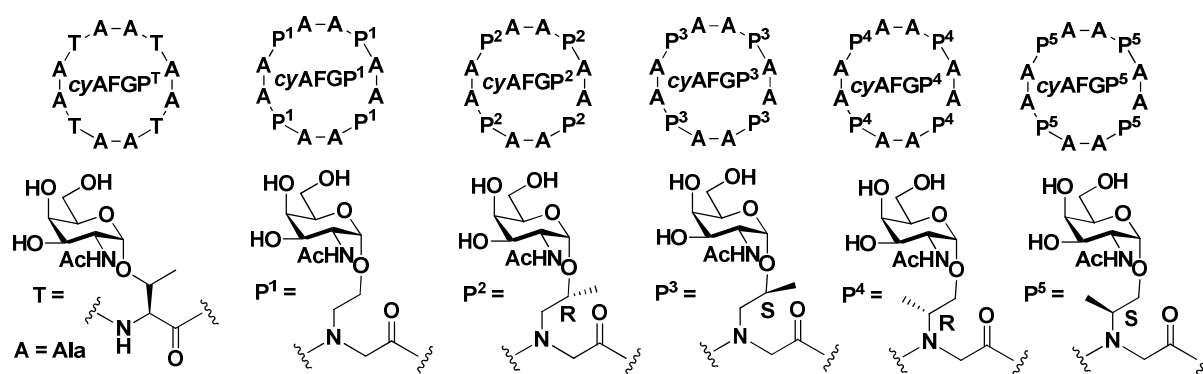


Figure 2.15: Analogues de AFGP8.

2. Post-modifications chimiques - Ligation par CuAAC sur support

La post-modification sur support solide de peptoides, utilisant la réaction de CuAAC (chimie click), a été en premier lieu étudiée par Kirshenbaum. Ses travaux concernent la conjugaison de nucléobases et de fluorophores.¹⁸⁷ Certaines études menées par Disney et coll.¹⁸⁸ ont permis le développement de ligands multivalents ciblant spécifiquement les ARN, en particulier ceux impliqués dans l'apparition des dystrophies myotoniques de type 1 et 2 (DM1 et DM2).^{189,190} Ces dystrophies myotoniques apparaissent lorsque des ARN mutants lient un facteur d'épissage à savoir la protéine MBNL-1 (*Muscle Blind-like 1*). Les structures synthétisées présentent plusieurs copies d'un ligand aminoglycoside, la kanamycine A, qui possède une grande affinité pour certaines boucles d'ARN mutants (Schéma 2.7). Pour ce faire, les modules contenant la kanamycine, fonctionnalisés par un alcyne, ont été greffés par CuAAC sur les chaînes latérales azidopropyles du peptoid. Plusieurs paramètres ont été analysés tels que le nombre optimal de modules kanamycine ainsi que la distance optimale entre eux. Cette distance a été ajustée en faisant varier le nombre de modules espaceurs. Une fois la structure optimale définie, les auteurs ont employé différentes chaînes latérales R au niveau des modules espaceurs afin d'optimiser les propriétés pharmacocinétiques de ces ligands multivalents (assimilation et localisation cellulaires, toxicité).

¹⁸⁷ Jang, H.; Fafarman, A.; Holub, J. M.; Kirshenbaum, K. Click to Fit: Versatile Polyvalent Display on a Peptidomimetic Scaffold. *Organic Letters* **2005**, 7, 1951-1954.

¹⁸⁸ Lee, M. M.; French, J. M.; Disney, M. D. Influencing uptake and localization of aminoglycoside-functionalized peptoids. *Molecular BioSystems* **2011**, 7, 2441-2451.

¹⁸⁹ Lee, M. M.; Childs-Disney, J. L.; Pushechnikov, A.; French, J. M.; Sobczak, K.; Thornton, C. A.; Disney, M. D. Controlling the Specificity of Modularly Assembled Small Molecules for RNA via Ligand Module Spacing: Targeting the RNAs That Cause Myotonic Muscular Dystrophy. *Journal of American Chemical Society* **2009**, 131, 17464-17472.

¹⁹⁰ Lee, M. M.; Pushechnikov, A.; Disney, M. D. Rational and Modular Design of Potent Ligands Targeting the RNA That Causes Myotonic Dystrophy 2. *ACS Chemical Biology* **2009**, 4, 345-355.

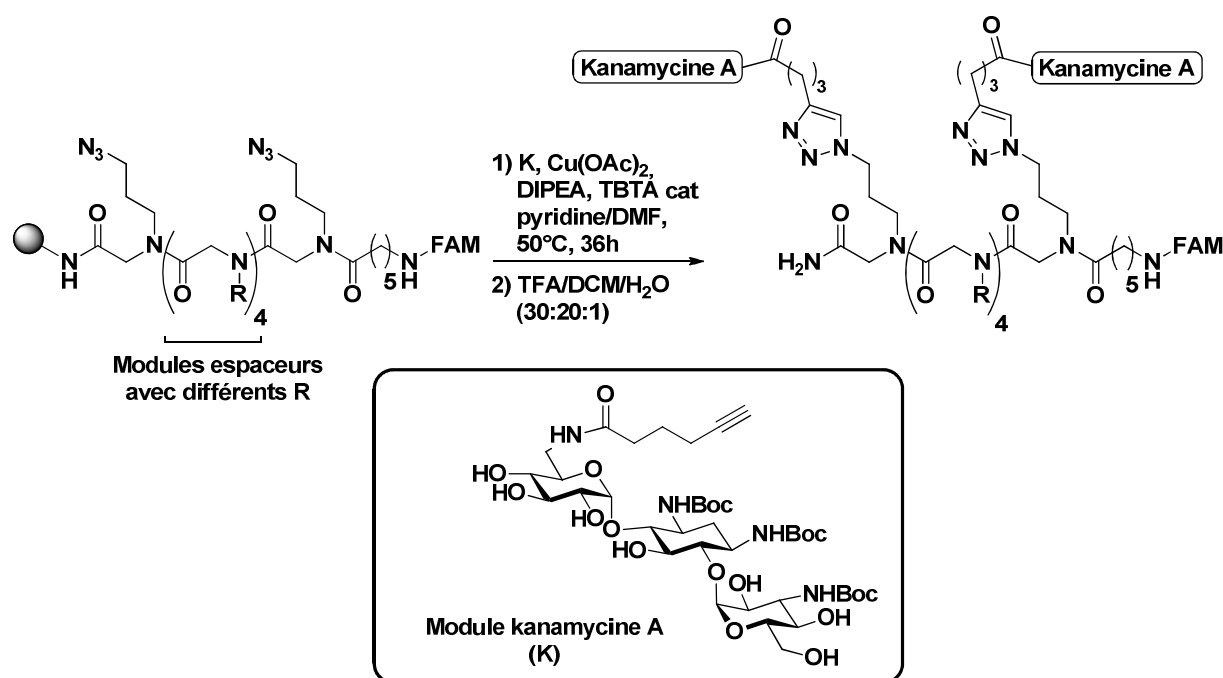


Schéma 2.7: Synthèse des ligands multivalents ciblant les ARN associés aux dystrophies myotoniques.

Dans la continuité de leurs travaux sur le développement de composés peptoides utilisés comme agents anti-adhésifs, Messersmith et al. ont élaboré des édifices comprenant trois domaines distincts: un pentapeptide (DOPA-Lys-DOPA-Lys-DOPA), un polypeptide composé de 20 unités portant des chaînes latérales méthoxyéthyles et une région saccharidique (glucose ou maltose) qui est reliée au dernier monomère peptoidique par un lien triazolyle (Figure 2.16).¹⁹¹ Ces édifices sont des mimes du glycocalyx cellulaire en termes de composition et de capacité à inhiber les interactions non spécifiques. Ils ont été greffés sur des surfaces en dioxyde de titane (TiO₂) à l'aide de leur domaine pentapeptidique. Le TiO₂ a été choisi comme biomatériau représentatif de ce qui est communément utilisé dans les dispositifs médicaux. Cette étude a alors démontré que, contrairement aux peptoides non glycosylés, la présence de glycopeptoides greffés diminue considérablement l'attachement des protéines, des fibroblastes et des bactéries. De ce fait, cette propriété anti-adhésive permet de réduire les risques d'infections chez les patients en limitant les colonisations bactériennes au niveau des dispositifs médicaux.

¹⁹¹ Ham, H. O.; Park, S. H.; Kurutz, J. W.; Szleifer, I. G.; Messersmith, P. B. Antifouling Glycocalyx-Mimetic Peptoids. *Journal of American Chemical Society* **2013**, *135*, 13015-13022.

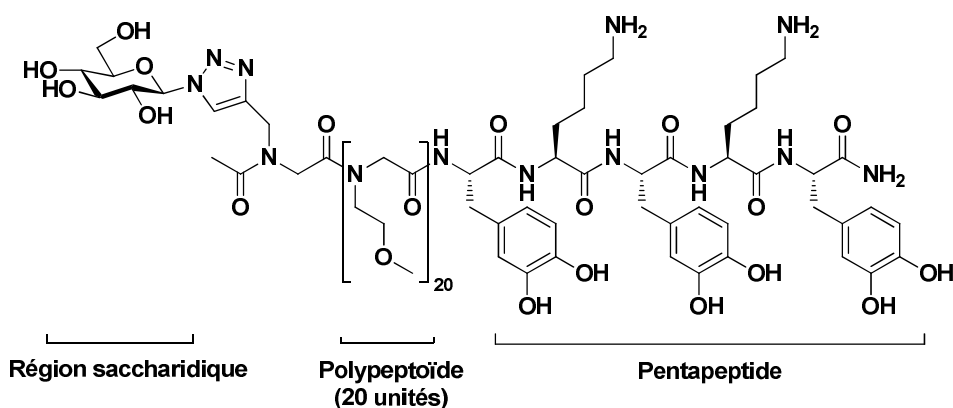


Figure 2.16: Edifice polymère glucosylé - agent anti-adhésif.

D. Les β -glycopeptoides

La préparation de glycoclusters et de glycodendrimères constitués de plateformes β -peptoides, a été minutieusement étudiée par Takeda et coll.^{192,193,194}, sans que les termes "glycopeptide ou même "peptide" ne soient évoqués dans leurs publications. Le glycocluster présenté dans la figure 2.17,¹⁹⁵ est un exemple représentatif des structures non symétriques synthétisées par les auteurs. Pour ce faire, une stratégie de synthèse a été développée en modulant la distance entre les sucres et la plateforme β -peptide. Une variété de monomères protégés composés d'espacesurs amino-acides (glycine, β -alanine, GABA) ont été formés au préalable, avant d'être couplés en présence du diéthylcyanophosphonate (DEPC). Ces méthodes de synthèse ont également été employées pour le développement de composés conjugués à un épitope antigénique, issu d'un polysaccharide pectique anti-ulcéreux, dans le cadre d'une approche en immunothérapie.¹⁹⁶

¹⁹² Hada, N.; Sato, K.; Jin, Y.; Takeda, T. Synthesis of New Glycoclusters Derived from β -Alanine. Part 2: Optionally Modulated Distance between Side-Chain Branched Points. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2005**, *53*, 1131-1135.

¹⁹³ Hada, N.; Sonoda, Y.; Takeda, T. Synthesis of a novel glycosphingolipid from the millipede, *Parafontaria laminata armigera*, and the assembly of its carbohydrate moiety into multivalent structures. *Carbohydrate Research* **2006**, *341*, 1341-1352.

¹⁹⁴ Sato, K.; Hada, N.; Takeda, T. Syntheses of new peptidic glycoclusters derived from β -alanine: di- and trimerized glycoclusters and glycocluster-clusters. *Carbohydrate Research* **2006**, *341*, 836-845.

¹⁹⁵ Sato, K.; Hada, N.; Takeda, T. Synthesis of new peptidic glycoclusters derived from β -alanine. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 9331-9335.

¹⁹⁶ Jin, Y.; Hada, N.; Oka, J.; Kanie, O.; Daikoku, S.; Kanie, Y.; Yamada, H.; Takeda, T. Syntheses of Model Compounds Related to an Antigenic Epitope in Pectic Polysaccharides from *Bupleurum falcatum* L. (II). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2006**, *54*, 485-492.

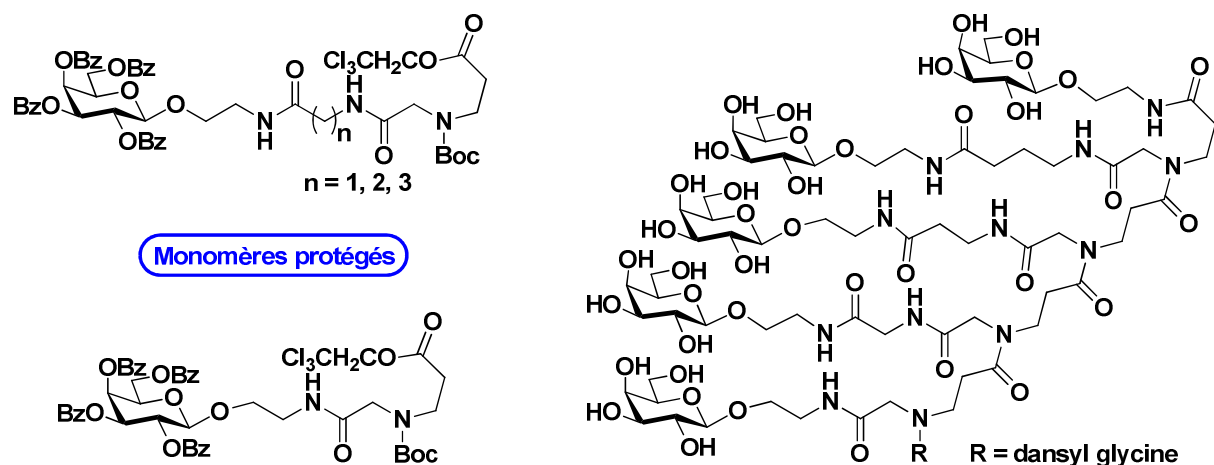


Figure 2.17: Exemple de glycocluster non symétrique obtenu à partir de monomères protégés.

L'utilisation de β -peptoides comme plateforme pour la présentation multivalente de sucres a également été étudiée dans notre groupe. Ces travaux concernent la glycoconjugaison, par réactions de CuAAC, de composés β -peptoides N-propargyles avec des sucres fonctionnalisés par un groupement azoture.¹⁹⁷ Les plateformes β -peptoides ont été préalablement synthétisées à l'aide de la méthode submonomère en solution (en haut à gauche du schéma 2.8). Les glycoconjugués linéaire et cyclique ont été obtenus par CuAAC sous activation micro-ondes, suivi d'une élimination des groupements acétates des sucres et de l'hydrolyse de l'ester de *tert*-butyle. Ces glycoclusters ont ensuite fait l'objet d'analyses sur leurs capacités à interagir avec des lectines liant le galactose, telles que *Erythrina cristagalli* (ECA) et *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IL). Les analyses effectuées par titration calorimétrique isotherme, ont permis de mettre en exergue que le glycocluster cyclique présentait une bien meilleure affinité envers PA-IL ($K_d = 296$ nM) que le dérivé linéaire ($K_d = 1,8$ μ M). De plus, il a été démontré que ce glycocluster cyclique pouvait lier une lectine PA-IL sur chaque résidu galactose (ratio glycocluster/lectine 1:4).

¹⁹⁷ Cecioni, S.; Faure, S.; Darbost, U.; Bonnamour, I.; Parrot-Lopez, H.; Roy, O.; Taillefumier, C.; Wimmerová, M.; Praly, J-P.; Imbert, A.; Vidal, S. Selectivity among Two Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of "Clicked" Multivalent Glycoclusters. *Chemistry-A European Journal* **2011**, *17*, 2146-2159.

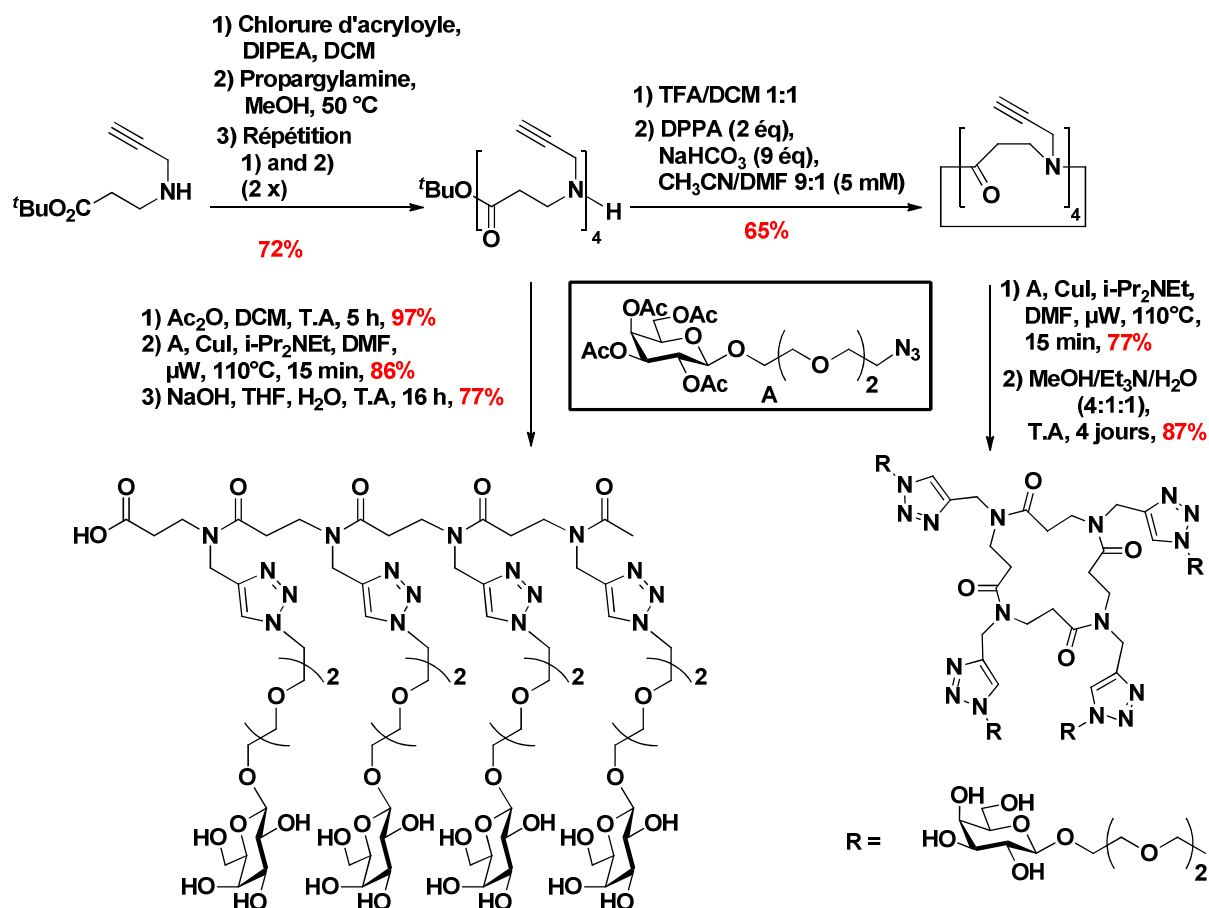
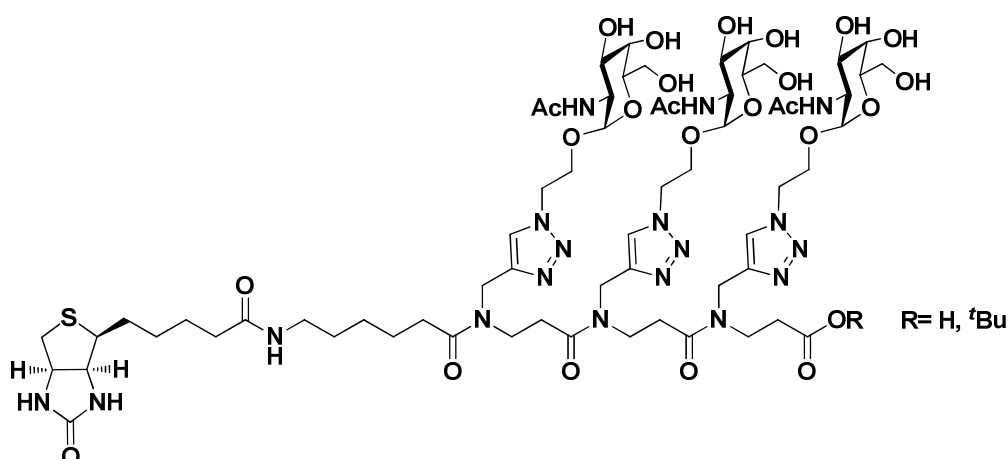


Schéma 2.8: Synthèse des glycoclusters multivalents linéaires et cycliques.

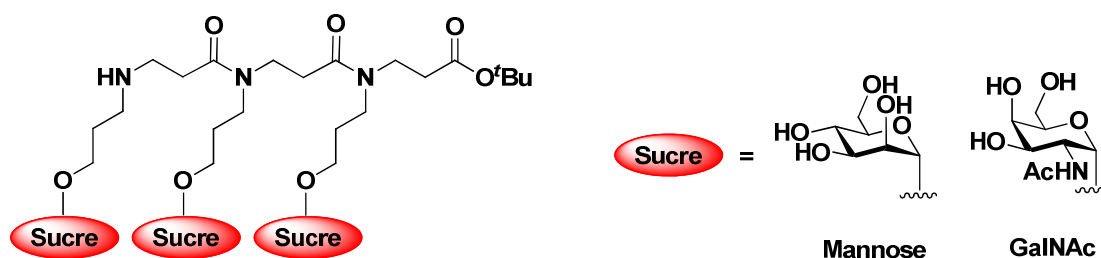
Dans le cadre de ses travaux antérieurs à ma thèse, Marielle Barra a utilisé le squelette β -peptoïde pour la présentation multivalente de mimes de l'antigène Tn (Figure 2.18).¹⁹⁸ Elle a ainsi préparé un azoture α -O-GalNAc per-acétylé qu'elle a greffé à l'aide de la réaction de CuAAC au squelette β -tripeptoïde, obtenu au préalable par la méthode submonomère en solution. Ce glycocluster est conjugué à un motif biotine-espaceur afin de pouvoir effectuer des tests d'antigénicité *in vitro* par la méthode de l'ELISA. Ces tests ont révélé que cette structure était efficacement reconnue par deux des trois anticorps monoclonaux anti-Tn employés et que la nature chimique de l'extrémité C-terminale n'avait pas d'influence sur le phénomène de reconnaissance par les anticorps. Ces résultats encourageants ont donc incité l'équipe à continuer dans ce domaine mais en élaborant, cette fois-ci, des structures plus complexes qui font l'objet de mon travail doctoral.

¹⁹⁸ Barra, M. Synthèse et étude de β -peptides glycoconjugués. Application en immunothérapie antitumorale. Thèse de Chimie organique et biologique, Université Blaise Pascal: Clermont-Ferrand, **2009**.

Figure 2.18: β -tripeptotide *O*-GalNAc utilisé pour les tests d'antigénicité.

III. Accès aux plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées

Dans cette partie, sera présentée la synthèse de la plateforme β -tripeptotide *O*-GalNAc (Figure 2.19). Afin de mimer la *O*-glycosylation naturelle caractéristique de l'antigène Tn, présentée par les mucines, l'anométrie des sucres conjugués sur cette plateforme sera de type α . Comme nous l'avons précisé en introduction de ce chapitre, nous développerons également la synthèse d'une plateforme greffée avec des résidus *O*- α -mannose. Les travaux réalisés pour son obtention, nous ont permis de mettre au point nos stratégies de synthèse. Par ailleurs, il est important de noter que plusieurs structures mannosylées ont été soumises aux tests immunologiques. Lors de ces tests, elles nous ont servi de référence ou d'élément de comparaison puisqu'elles ne miment pas le cluster trimérique Tn.

Figure 2.19: Structure générale des plateformes *O*-glycoconjuguées à synthétiser.

La conception de ces plateformes glycosylées a nécessité la synthèse au préalable de monomères de β -alanines *N*-substituées (Figure 2.20) à partir du D-mannose (composé **2.12**) et du D-GalNAc (composé **2.13**).

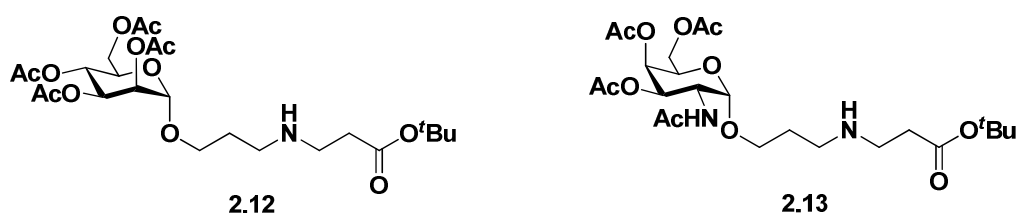


Figure 2.20: Monomères à synthétiser au préalable.

A partir de ces derniers, nous avons envisagé d'adapter en solution les deux approches caractéristiques de la synthèse des peptoides. D'une part la méthode "submonomère" et d'autre part la méthode monomère (couplages peptidiques). Pour mener à bien ces stratégies de synthèse, les sucres ont été protégés au niveau de leur fonctions alcools. Notre choix s'est porté sur le groupement acétate, puisqu'il est très facile de préparer des sucres peracétylés, de les désacétyler sélectivement ou d'utiliser directement l'acétate anomère dans une réaction de glycosylation. L'objectif étant la mise en place de conditions de réactions adéquates dans le but d'être transposées à la synthèse des glycosides dérivés du GalNAc. Pour obtenir les plateformes β -glycopeptoides décrites ci-dessus, les sucres ont été au final désacétylés. L'ensemble des résultats et optimisations sur la synthèse des monomères de β -alanines *N*-substituées ainsi que sur les deux approches qui en résultent seront discutés.

A. Synthèse des monomères amines

1. Optimisation de la synthèse du monomère mannosylé 2.12

a. Synthèse du glycoside 2.16

Pour la synthèse du monomère dérivé du mannose **2.12**, il nous fallait préparer, dans un premier temps, l'azoture de glycoside **2.16** (Schéma 2.9).

Le D-mannose est tout d'abord peracétylé dans l'anhydride acétique en présence de diiode utilisé comme catalyseur acide de Lewis.¹⁹⁹ Le composé **2.14** est obtenu de manière quantitative sous forme d'un mélange d'anomères inséparables (α/β 70:30 - calculé sur le spectre RMN ^1H). D'après la littérature, ce ratio peut être influencé par la quantité de diiode ajoutée et par le temps de réaction.

¹⁹⁹ Kartha, K. P.R.; Field, R. A. Iodine: A Versatile Reagent in Carbohydrate Chemistry IV. Per-O-Acetylation, Regioselective Acylation and Acetolysis. *Tetrahedron* **1997**, 53, 11753-11766.

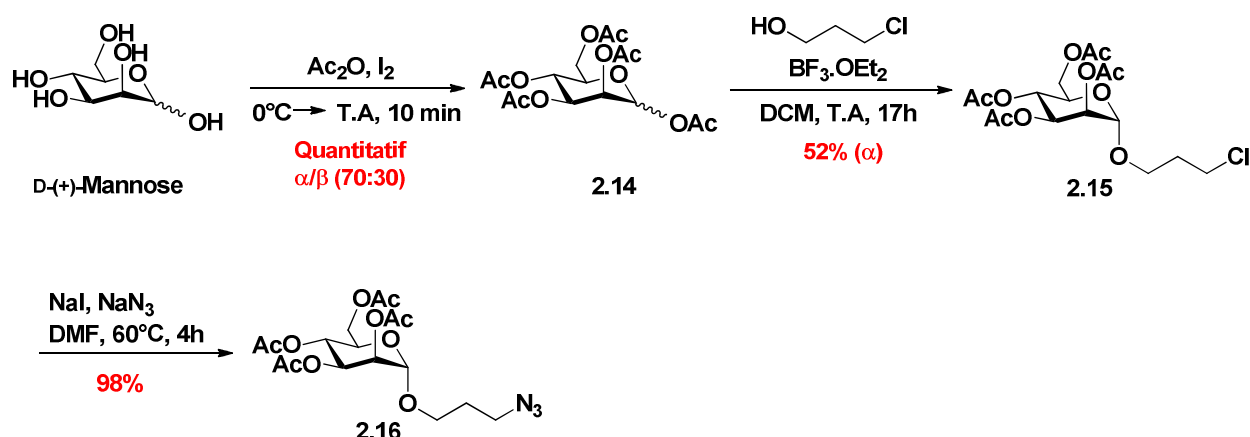


Schéma 2.9: Accès au glycoside 2.16.

La glycosylation est réalisée directement sur le mélange d'acétates anomères en présence de $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ et de 3-chloropropanol dans le DCM²⁰⁰, à température ambiante. Après purification par chromatographie sur gel de silice, nous avons réussi à isoler l'anomère α **2.15** qui est obtenu avec un rendement de 52%. L'analyse par RMN ^1H (CDCl_3), de la constante de couplage viscinale $J_{1/2} = 1,6$ Hz, est caractéristique d'un couplage $\text{H}_1\text{-H}_2$ équatorial-équatorial. Par ailleurs, on peut penser que la réactivité préférentielle d'un des deux anomères peut être à l'origine de ce rendement mitigé.

L'étape suivante consiste en l'introduction d'un motif azoture par substitution du chlore sur le glycoside **2.15** en utilisant l'azoture de sodium dans le DMF à 60°C .²⁰⁰ Le 3'-azidopropyl-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-mannopyranoside **2.16** est alors formé avec un excellent rendement de 98%. Par ailleurs, un premier essai non fructueux avait été réalisé, dans les mêmes conditions, mais en prenant CH_3CN ²⁰¹ comme solvant mais aucune substitution n'avait été observée. A partir du glycoside **2.16**, nous avons envisagé différentes stratégies de synthèse dans le but d'obtenir le monomère **2.12**.

b. Stratégies établies à partir du glycoside 2.16

La première stratégie a consisté en une réduction conduisant à l'amine **2.17** qui est directement engagée, sans purification préalable, dans une réaction d'aza-Michael avec l'acrylate de *tert*-butyle (Schéma 2.10).

²⁰⁰ Hayes, W.; Osborn, H. M. I.; Osborne, S. D.; Rastall, R. A.; Romagnoli, B. One-pot synthesis of multivalent arrays of mannose mono- and disaccharides. *Tetrahedron* **2003**, 59, 7983-7996.

²⁰¹ Yu, H.; Huang, S.; Chokhawala, H.; Sun, M.; Zheng, H.; Chen, X. Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Naturally Occuring and Non-Natural α -2-6-Syaliltransferase with Extremely Flexible Donor-Substrate Specificity. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 3938-3944.

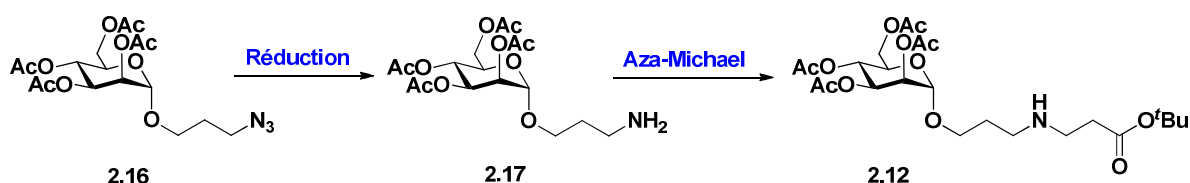


Schéma 2.10: Première stratégie envisagée pour la synthèse du monomère mannosylé 2.12.

Deux essais ont été effectués en faisant varier les solvants. Les conditions de réactions et les résultats sont présentés dans le tableau 2.1.

Essais	Réduction	Aza-Michael	Rendements
1	H ₂ (4 Bar), Pd/C	Acrylate de <i>tert</i> -butyle (1 éq)	-
	MeOH, T.A, 2h	MeOH, 50°C, 24h	
2	H ₂ (4 Bar), Pd/C	Acrylate de <i>tert</i> -butyle (1 éq)	-
	AcOEt, T.A, 2h	THF, 50°C, 24h	

Tableau 2.1: Conditions testées pour l'obtention du monomère 2.12.

Lors de la synthèse des β -peptoides en solution, les étapes d'aza-Michael sont communément réalisées dans le MeOH à 50°C.¹⁴⁸ Partant de ce constat nous avons donc, dans un premier temps, utilisé ce solvant. Cependant, le suivi par CCM et la caractérisation par RMN ¹H ont mis en évidence une élimination des groupements acétates. Nous avons, lors d'un deuxième essai, décidé d'utiliser l'AcOEt pour la réduction et le THF pour la réaction d'aza-Michael. Malheureusement, aucune des analyses en RMN ¹H (CDCl₃) des produits isolés après purification ne correspondent à la structure 2.12 attendue.

Face à ces échecs, nous avons émis plusieurs hypothèses. Nous nous sommes, tout d'abord, demandé si les conditions de réduction étaient efficaces. Pour vérifier ceci, nous avons réitéré l'expérience dans les mêmes conditions que l'essai 2 (Tableau 2.1) et analysé directement le produit formé par RMN ¹H (CDCl₃). Les signaux caractérisent bien l'amine 2.17. Les conditions de réduction définies étaient donc adéquates.

Nous nous sommes ensuite demandé si la réactivité de l'amine 2.17, pendant la réaction d'aza-Michael, était suffisamment importante ou si il ne fallait pas exacerber son caractère nucléophile (en ajoutant par exemple une base). De plus, nous avons constaté lors de ces expériences, que cette amine était instable dans le temps. Tous ces éléments conjugués, nous ont incité à définir une nouvelle stratégie (Schéma 2.11).

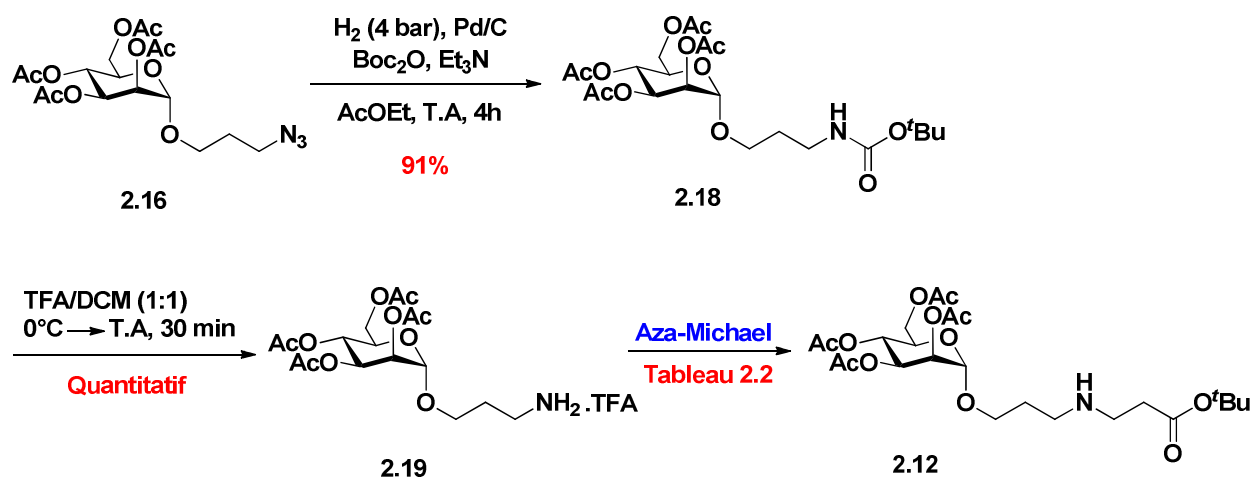


Schéma 2.11: Deuxième stratégie envisagée pour l'obtention du monomère mannosylé 2.12.

Le glycoside **2.16** est soumis à deux étapes successives (synthèses "one-pot") réalisées à température ambiante dans AcOEt. Tout d'abord, le groupement azoture de ce glycoside est, comme précédemment, réduit sous dihydrogène (4 bar) en présence de Palladium activé sur charbon puis l'amine obtenue réagit directement avec le dicarbonate de di-*tert*-butyle en présence de triéthylamine. Ceci permet de réduire l'azoture en amine, qui est piégée *in situ* sous forme de Boc carbamate. Ces réactions sont effectuées dans un autoclave et conduisent au composé **2.18** avec un rendement de 91%.

A ce stade, il nous a été possible d'effectuer différents essais afin de définir les conditions optimales pour l'étape d'aza-Michael à partir du sel de TFA **2.19** (Tableau 2.2). Celui-ci est auparavant obtenu quantitativement par élimination du groupement Boc du glycoside **2.18** dans un mélange TFA/DCM (1:1).

Essais	Sel de TFA 2.19	Acrylate de <i>tert</i> -butyle	Et ₃ N	Conditions	Rendements ^a
1	1 éq 0,1 M	1 éq	1 éq	THF 50°C, 20h	Traces
2	1 éq 0,1 M	1 éq	1 éq	CH ₃ CN 50°C, 26h	20%
3	1 éq 0,1 M	1 éq	2 éq	CH ₃ CN 50°C, 26h	53%
4	1 éq 0,1 M	1 éq	3 éq	CH ₃ CN 50°C, 26h	48%
5	2 éq 0,1 M	1 éq	3 éq	CH ₃ CN 50°C, 26h	61%
6	1 éq 0,1 M	3 éq	2 éq	CH ₃ CN 50°C, 26h	70%

^a Rendements en monomère **2.12** après purification par chromatographie flash.

Tableau 2.2: Optimisation de l'étape d'aza-Michael.

Nous avons donc modulé différents paramètres:

- Les ratios en sel de TFA **2.19**, en acrylate de *tert*-butyle et en triéthylamine.
- Le solvant anhydre.

Dans l'ensemble, tous les essais ont été réalisés à 50°C et dans des temps de réaction pratiquement identiques. Le premier essai n'a malheureusement pas été satisfaisant. A partir de cet essai, nous avons fait varier certains paramètres et nous avons fixé ceux dont l'influence sur le rendement était considérée comme positive. Tout d'abord, le remplacement du THF par CH₃CN a permis d'augmenter légèrement le rendement (essai 2). Une évolution encore plus forte de celui-ci (53% - essai 3) est obtenue, dans CH₃CN, en augmentant la quantité de triéthylamine (2 éq). Ceci paraît cohérent car la triéthylamine permet de déprotonner les sels de TFA et amplifie le potentiel nucléophile de l'amine résultante. Au vu de l'essai 4, l'ajout d'un équivalent supplémentaire de triéthylamine (3 éq), ne permet pas d'augmenter le rendement. Par ailleurs, à l'instar des travaux réalisés dans l'équipe sur la synthèse en solution des β -peptoïdes,¹⁴⁸ une quantité d'amine primaire sous forme de sel de TFA **2.19** plus importante que celle en acrylate de *tert*-butyle, améliore le rendement (essai 5). Néanmoins, le meilleur résultat est obtenu lorsque la quantité d'acrylate de *tert*-butyle est bien supérieure à celle du glycoside **2.19** (essai 6). Ce dernier essai a déterminé nos conditions optimales pour l'étape d'aza-Michael.

2. Application à la synthèse du monomère GalNAc 2.13

Après avoir réussi à mettre au point une séquence réactionnelle adéquate permettant de former le monomère **2.12**, il nous a été alors possible de l'appliquer à la synthèse du monomère GalNAc **2.13** avec, cependant, quelques différences (Schéma 2.12).

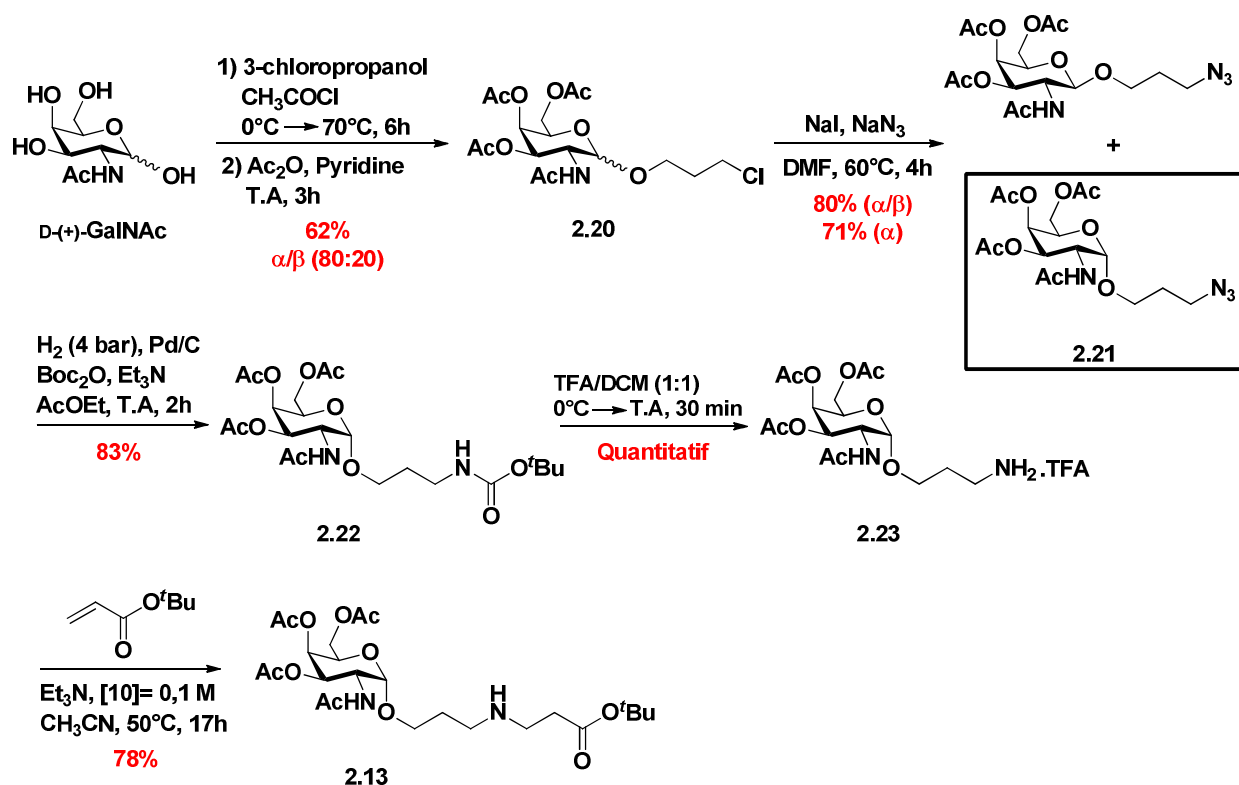


Schéma 2.12: Accès au monomère dérivé du GalNAc **2.13**.

La première porte sur la chronologie des étapes de peracétylation et de glycosylation. Il est reconnu que le groupement acétate en position 2, lors de la glycosylation du mannose peracétylé **2.14**, entraîne par assistance anchimérique, la synthèse majoritaire de l'anomère α (passage par un cation ponté). Or dans le cas du résidu GalNAc, l'acétamide est en équatoriale. Dans ce cas, l'assistance anchimérique conduit principalement à l'anomère β . Pour contourner ce fait, nous avons choisi d'effectuer une glycosylation de Fischer qui conduit à l'isomère α par "effet anomère". La glycosylation est réalisée sur le D-GalNAc par traitement avec du chlorure d'acétyle dans le 3-chloropropanol à 70°C pendant 6h.²⁰¹ Le 3'-chloropropyl-2-acétamido-2-déoxy- α/β -D-galactopyranoside est ainsi obtenu. Pour des raisons pratiques, il est directement peracétylé en présence d'anhydride acétique et de pyridine à température ambiante pendant 3h. Le glycoside **2.20** est alors formé sous forme d'anomères inséparables (ration α/β 80:20 - mesuré en RMN ¹H) avec un rendement de 62%. La deuxième différence par rapport à la synthèse du

monomère **2.12**, réside dans le fait qu'il nous a été impossible après ces deux premières étapes de séparer les anomères α et β .

A ce stade les étapes qui suivent sont identiques à celles optimisées pour les glycoconjugués mannosylés. Nous avons débuté par une substitution, du chlore par un motif azoture par traitement avec de l'iodure de sodium et de l'azoture de sodium dans le DMF à 60°C. Le suivi par CCM de la réaction a mis en évidence une séparation entre les deux anomères α et β . Après purification par chromatographie sur gel de silice, un produit majoritaire est isolé dont l'HR-MS était bien en rapport avec l'azoture attendu. Pour ce composé, la constante $J_{H1-H2} = 3,6$ Hz (CDCl_3) est caractéristique d'un couplage H_1-H_2 équatorial-axial ($J_{\text{théorique}}(\text{eq-ax}) = 0-5$ Hz). Nous sommes donc parvenu à obtenir le galactopyranoside **2.21** avec un rendement de 71%.

Il est ensuite soumis à deux réactions successives dans l'AcOEt à température ambiante pendant 2h. Nous avons, tout d'abord, réduit le groupement azoture sous dihydrogène (4 bar) en présence de Pd/C puis protégé l'amine primaire résultante sous forme de carbamate de *tert*-butyle (Boc). Ces deux réactions sont effectuées dans un autoclave et le glycoside **2.22** est obtenu avec un rendement de 83%. L'amine est déprotégée quantitativement en présence de TFA dans le DCM pour donner le sel de TFA **2.23**.

Celui-ci est directement engagé dans l'étape d'aza-Michael en utilisant les conditions optimisées auparavant (Tableau 2.2, essai 6). Par ailleurs, nous avons laissé évoluer la réaction moins longtemps (17h au lieu de 26h) afin d'éviter la formation en trop grande quantité du glycoconjugué issu de la double aza-Michael. Le monomère GalNAc **2.13** est produit avec un rendement de 78%.

Conclusion

Nous sommes donc parvenu à synthétiser les glycosides dérivés du mannose **2.12** et du GalNAc **2.13** après plusieurs études méthodologiques. Ces monomères ont été, par la suite, utilisés comme synthons pour la formation des plateformes β -tripeptoides O-glycosylées. Pour ce faire, nous avons appliqué, en solution, la méthode submonomère et la méthode monomère. L'ensemble des résultats obtenus sont présentés ci-après.

B. Méthode submonomère en solution

1. Optimisations initiales sur la synthèse des β -peptoides

La simplicité structurale des β -peptoides permet de les synthétiser en utilisant la méthode submonomère grâce à laquelle les résidus peptoides sont créés directement, de manière itérative, sur la chaîne en croissance (Schéma 2.2B). Chaque itération comporte deux étapes successives: tout d'abord une acylation de l'amine terminale en présence de chlorure d'acryloyle suivie d'une réaction d'aza-Michael de l'intermédiaire acylé avec une amine appropriée.

Des efforts d'optimisation sur la synthèse des β -peptoides par la méthode submonomère en solution ont donc été menés dans l'équipe. L'objectif était de définir des méthodologies efficaces et compétitives vis-à-vis des synthèses supportées. Celles-ci devaient présenter les mêmes avantages en terme de rapidité et d'économie de purification mais avec l'avantage supplémentaire de pouvoir être réalisées à l'échelle de plusieurs grammes. Les travaux réalisés par le Dr. Thomas Hjelmgaard¹⁴³ (post-doctorant entre 2008 et 2010) et par Cécile Caumes¹⁴⁸ (doctorante entre 2008 et 2011) notamment sur la synthèse de β -tétrapeptoides vont dans ce sens. Ils ont réussi à développer la synthèse en solution de ces composés en sept étapes avec de très bons rendements globaux et d'excellentes puretés (Schéma 2.3). Tous les intermédiaires réactionnels sont isolés soit après filtration (étape d'acylation) soit après concentration (étape d'aza-Michael). Une fois isolés, ils sont suffisamment purs pour être directement engagés dans l'étape suivante. Une seule chromatographie sur gel de silice est ainsi nécessaire pour l'obtention du produit final.

Pour acquérir ces résultats, ils ont, entre autre, amélioré les étapes d'acylations. Ils ont prouvé que le remplacement du DCM par le THF et surtout par l'AcOEt favorisait la précipitation des sels d'ammonium (ici chlorure de triéthylammonium), responsables de l'apparition de sous-produits indésirables. Ils sont alors facilement éliminés par filtration. Ceci permet de former des intermédiaires acylés plus purs. De plus, l'utilisation de l'AcOEt comme solvant pour l'acylation ainsi que l'utilisation de 2,2 équivalents de triéthylamine sont des facteurs qui participent à l'amélioration du rendement global. Grâce à ces améliorations, les rendements obtenus sont supérieurs à ceux rapportés dans la littérature pour les synthèses supportées de β -tétrapeptoides.

2. Application à la synthèse des plateformes β -tripeptoïdes *O*-glycosylées

Dans le cadre de cette thèse, nous avons tenté d'appliquer la méthode submonomère en solution pour la synthèse des plateformes β -glycopeptoïdes. La méthode submonomère a été, dans un premier temps, expérimentée à partir du monomère **2.12** afin d'obtenir la plateforme β -tripeptoïde *O*-mannosylée **2.27**. Comme nous l'avons précisé auparavant, les glycoconjugués mannosylés servent à optimiser les conditions réactionnelles avant que celles-ci ne soient adaptées à la synthèse des glycoconjugués dérivés du GalNAc. La séquence réactionnelle générale est présentée sur le schéma 2.13.

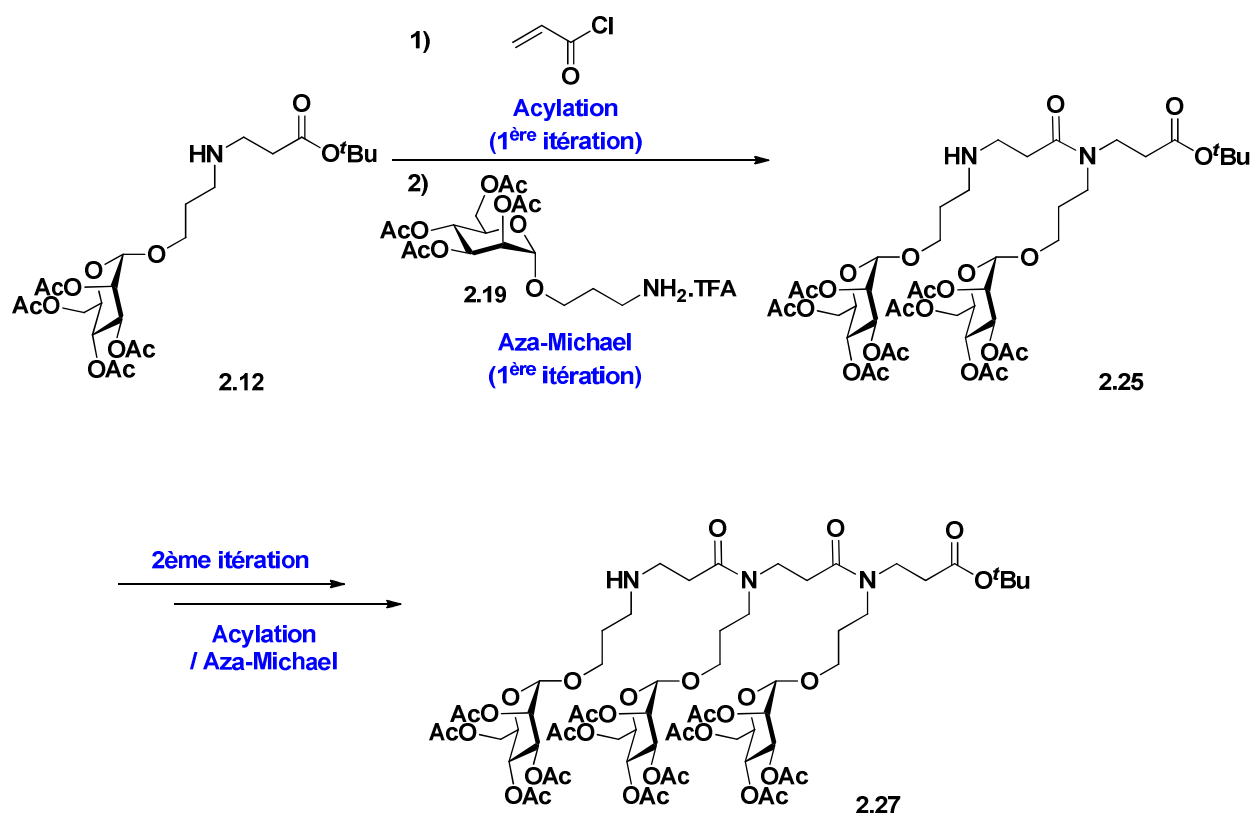


Schéma 2.13: Application de la méthode submonomère en solution sur la synthèse du glycoconjugué **2.27**.

La plateforme β -tripeptoïde *O*-mannosylée doit donc être obtenue après deux itérations. Pour la première itération (Schéma 2.14), nous avons décidé d'utiliser pour l'étape d'acylation, les conditions optimales définies par les travaux précédents du groupe. De ce fait, le glycoside **2.12** (1 éq, 0,2 M) est, au départ, traité par le chlorure d'acryloyle (1,2 éq) et la triéthylamine (2,2 éq) dans l'AcOEt. Au bout d'1h d'agitation à 0°C, l'analyse du milieu par CCM a révélé la présence d'un produit très majoritaire que nous avons supposé être le produit acylé **2.24** attendu. Après élimination des sels de chlorure de triéthylammonium, celui-ci est directement engagé dans

l'étape d'aza-Michael sans purification. Pour cette étape, nous nous sommes inspirés des conditions optimales mises en place pour la formation des monomères **2.12** et **2.13** (Tableau 2.2 - Essai 6). La différence, ici, réside dans le fait que l'acrylamide **2.24** et le sel de TFA **2.19** sont équimolaires (1 éq chacun, 0,1 M). Ceci nous permet d'éviter de consommer une quantité trop importante en glycosides mannosylés. Ainsi, les deux composés sont mélangés dans CH₃CN anhydre en présence de triéthylamine (2 éq) à 50°C.

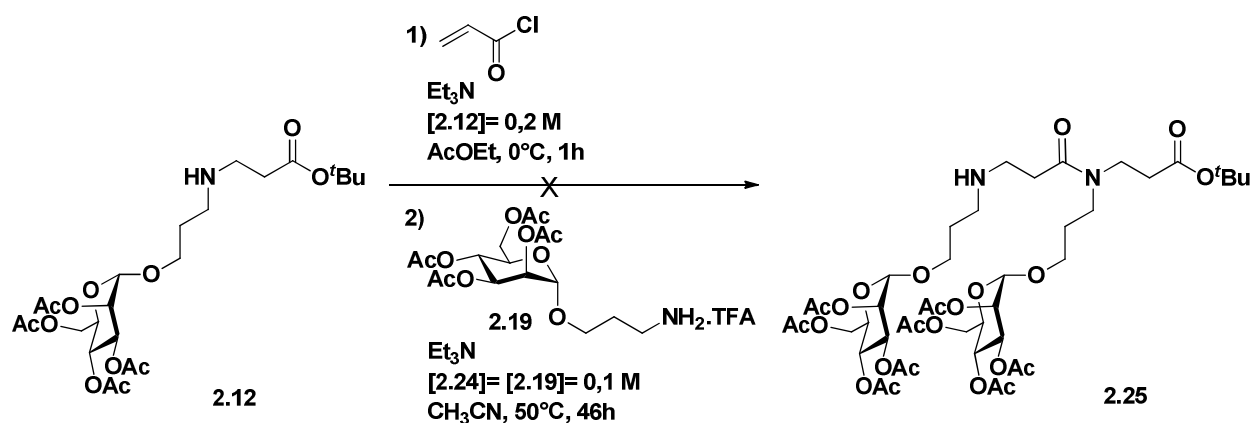


Schéma 2.14: Première itération sans purification intermédiaire.

Malheureusement, aucune réaction n'a été détectée. Après purification par chromatographie flash sur gel de silice, nous avons récupéré le matériel de départ et un produit dont les signaux en RMN ¹H (CDCl₃) ne sont pas en rapport avec le β -dipeptide glycosylé **2.25** souhaité. Deux autres essais pour cette première itération ont alors été effectués. Mais pour chacun d'entre eux, nous avons décidé de purifier le glycoside acylé **2.24** avant l'étape d'aza-Michael, afin d'éliminer d'éventuelles impuretés indésirables. En utilisant les mêmes conditions d'acylation que précédemment, ce composé est obtenu avec un rendement de 96% (Schéma 2.15). A partir de ce dernier, nous avons fait varier certains paramètres pour l'étape d'aza-Michael à savoir la quantité en glycosides et en base. Par ailleurs, pour chaque essai, la concentration égale à 0,1 M concerne le sucre limitant. L'utilisation de CH₃CN anhydre comme solvant et la température (50°C) sont des paramètres qui sont restés fixes.

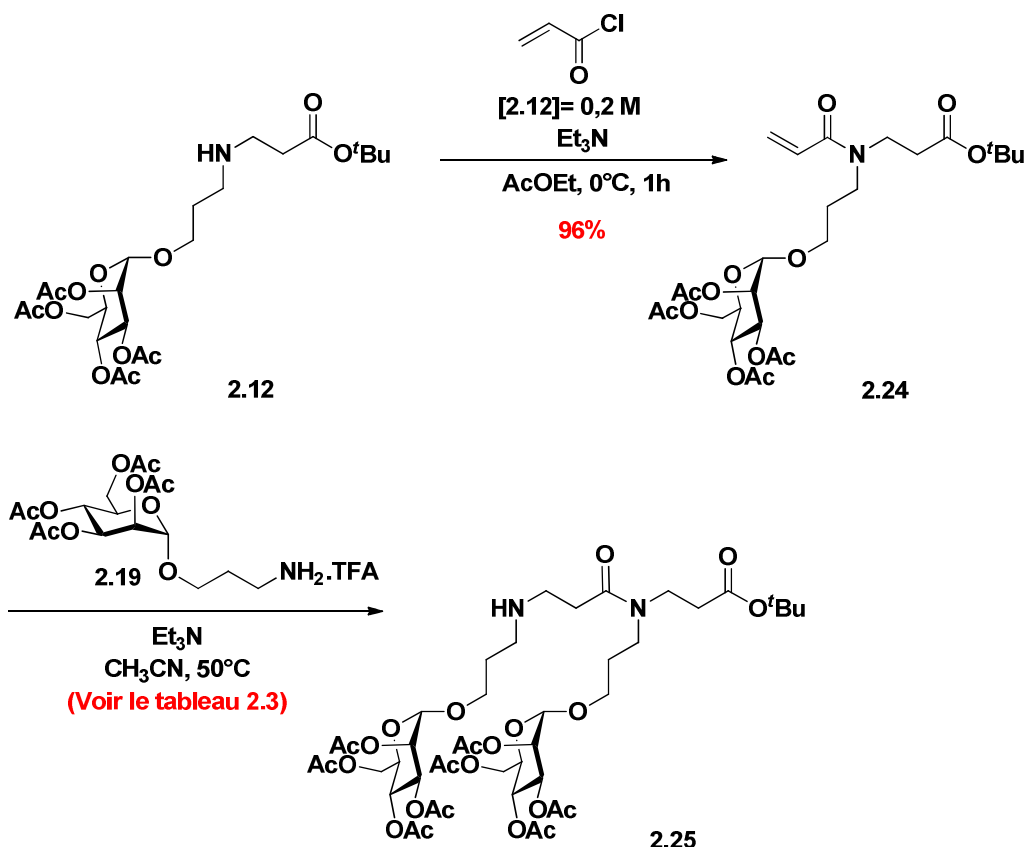


Schéma 2.15: Optimisation de la première itération.

Les résultats pour l'étape d'aza-Michael sont présentés dans le tableau 2.3.

Essais	Sel de TFA 2.19	Acrylamide 2.24	Et ₃ N	Conditions	Rendements ^a
1	1 éq	1,2 éq	2 éq	[2.19]= 0,1 M 18h	30%
2	3 éq	1 éq	6 éq	[2.24]= 0,1M 40h	41%

^a Rendements en glycoconjugué 2.25 après purification par chromatographie flash

Tableau 2.3: Essais d'optimisation de l'étape d'aza-Michael (première itération).

Dans un premier temps, nous avons augmenté légèrement la quantité en acrylamide 2.24 (1,2 éq). Après purification, le β -dipeptide *O*-mannosylé 2.25 est isolé avec un rendement de 30%.

Les travaux de Cécile Caumes et de Thomas Hjelmgaard pour la synthèse en solution des β -peptoides par la méthode submonomère,^{143,148} mettent en exergue l'utilisation d'une amine primaire en excès. Le rendement relativement faible obtenu précédemment, nous a donc incité à

effectuer un nouvel essai où, cette fois-ci, nous avons fortement augmenté la quantité en amine primaire sous forme de sel de TFA **2.19** (3 éq) ainsi que la quantité en triéthylamine (6 éq). Après purification, le glycoconjugué **2.25** est formé avec un rendement de 41%. Malgré ces résultats non satisfaisants, nous avons quand même décidé de faire la deuxième itération, nous permettant d'obtenir le β -tripeptoïde *O*-mannosylé **2.27** (Schéma 2.16). Comme pour la première itération, nous avons repris les conditions optimales concernant l'acylation. Pour l'étape d'aza-Michael, nous avons utilisé les conditions qui limitent la consommation en glycosides mannosylés (Tableau 2.3 - Essai 1). Après purification, nous obtenons l'acrylamide **2.26** avec un rendement de 85% puis le glycoconjugué **2.27** attendu avec un rendement de 21%.

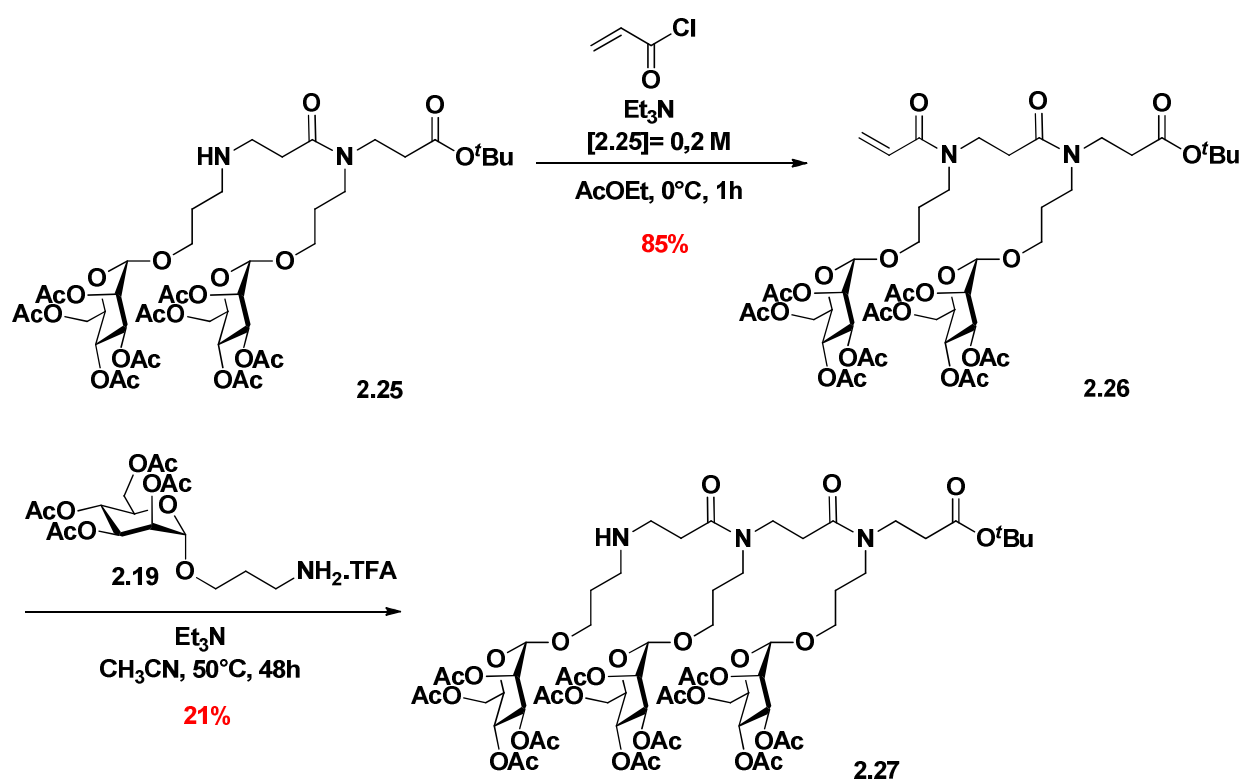


Schéma 2.16: Deuxième itération.

3. Conclusion de l'étude

L'objectif de cette étude était d'appliquer la méthode submonomère en solution à la synthèse des plateformes β -tripeptoïdes *O*-glycosylées. Dans l'ensemble, pour chaque itération, les étapes d'aza-Michael ont donné des résultats insuffisants. Les conditions mises en place pour la synthèse des monomères amines **2.12** et **2.13**, n'ont pas conduit à l'obtention efficace des plateformes β -di et β -tripeptoïdes *O*-mannosylées. Les modifications apportées n'ont également pas permis une amélioration des rendements. Cependant, nous n'avons pas continué à

approfondir l'optimisation de cette méthode. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons, à l'époque, travaillé en parallèle sur la synthèse des plateformes β -tripeptoides *O*-mannosylées par la méthode monomère (couplage peptidique) qui nous avait alors permis d'obtenir rapidement de bien meilleurs résultats.

C. Méthode monomère en solution

1. Optimisations à partir des glycoconjugués *O*-mannosylés

Suite aux résultats mitigés, obtenus avec la méthode submonomère, nous avons décidé d'utiliser la méthode monomère en solution afin de synthétiser plus efficacement les plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées souhaitées. Cette méthode a déjà été expérimentée avec succès, notamment par l'équipe de R. Roy, pour la synthèse en solution de composés α -glycopeptoides. Elle consiste à réaliser plusieurs couplages peptidiques permettant de lier, à chaque étape, différents monomères à un oligomère en croissance. Dans notre cas, ce sont des monomères de β -alanine *N*-substituées. Pour ce faire, il était nécessaire de mettre en place des conditions de couplage adéquates (choix d'un agent de couplage, du solvant, de la base). Il était également important de protéger certains groupes et d'en déprotéger d'autres pour prévenir des réactions non désirées. Par ailleurs, cette méthode a nécessité la préparation préalable de quantités importantes en monomères.

Nous avons appliqué cette stratégie de couplage à partir des glycosides dérivés du mannose (Schéma 2.17). Comme dans le cas de la méthode submonomère, nous sommes partis du synthon **2.12** que nous avons nommé, ici, monomère amine mannose (groupe amine libre et groupe carboxyle protégé). Après protection de son amine secondaire (introduction du groupement protecteur GP) et déprotection de l'acide sous forme d'ester de *tert*-butyle, nous obtenons le glycoside **2.29**, appelé monomère acide mannose. Ces deux monomères réagissent ensemble par couplage peptidique, après activation du monomère acide à l'aide d'un agent de couplage, pour donner le β -dipeptide *O*-mannosylé **2.30**. De la même manière, après l'obtention de l'acide **2.31**, celui-ci est activé puis couplé au monomère amine mannose **2.12** pour former le trimère **2.32**. De manière générale, il est commun d'activer la fonction acide carboxylique du monomère et non de l'oligomère en croissance afin d'éviter que celui-ci ne réagisse, de façon intramoléculaire, pour conduire à des oxazolones, souvent à l'origine de racémisations, ainsi qu'à des dicétopipérazines

dans le cas des dipeptides. Ici, puisque nous sommes en présence de β -peptoides glycosylés l'activation de l'acide du dimère **2.31** ne pose à priori pas de problème. La dernière étape consiste à éliminer le groupement protecteur de l'amine secondaire de la plateforme. Ainsi, à l'inverse des synthèses de peptoides et de peptides (synthèse de Merrifield) sur support solide, la méthode monomère que nous avons mis en place permet l'élongation du trimère de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale.

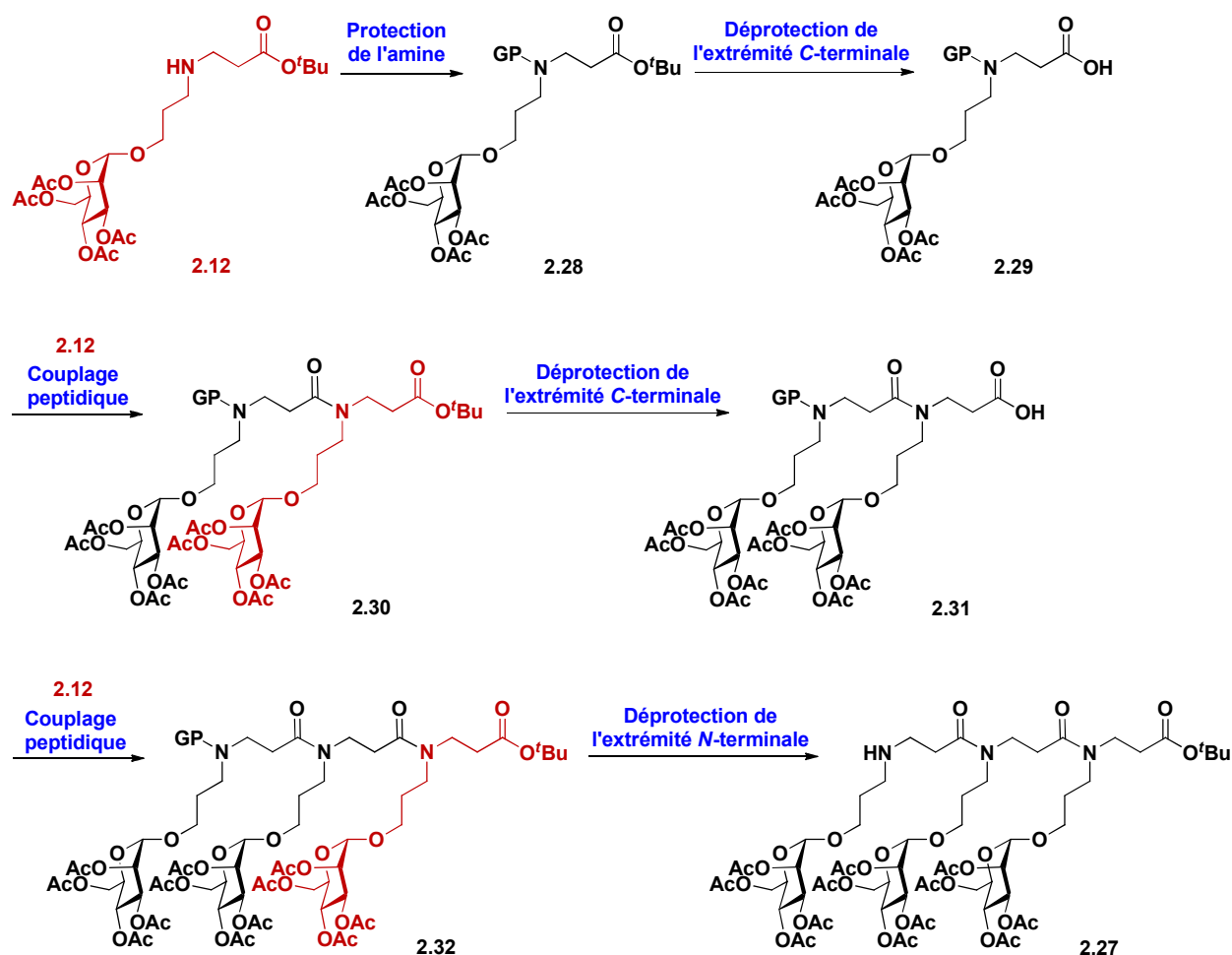


Schéma 2.17: Séquence réactionnelle pour la synthèse du trimère mannose **2.27** par la méthode monomère.

Les différentes conditions de synthèse ont ensuite été définies. Dans un premier temps, nous avons choisi de protéger l'amine avec un groupement carboxybenzyle car son élimination par hydrogénolyse, nous permet de laisser intact les groupements acétates des sucres. Pour ce faire, le monomère amine mannose **2.12** est traité avec le chloroformiate de benzyle et la triéthylamine à 0°C dans le DCM, pendant 24h.²⁰² Le glycoside **2.28** est alors isolé avec un rendement de 87%. Le monomère acide mannose **2.29** est formé quantitativement par hydrolyse de l'ester de *tert*-

²⁰² Mohler, D. L.; Shen, G. The synthesis of tethered ligand dimers for PPAR γ -RXR protein heterodimers. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, 4, 2082-2087.

butyle du composé **2.28** en présence de TFA dans le DCM à température ambiante pendant 30 min. Il est utilisé directement sans purification préalable (Schéma 2.18).

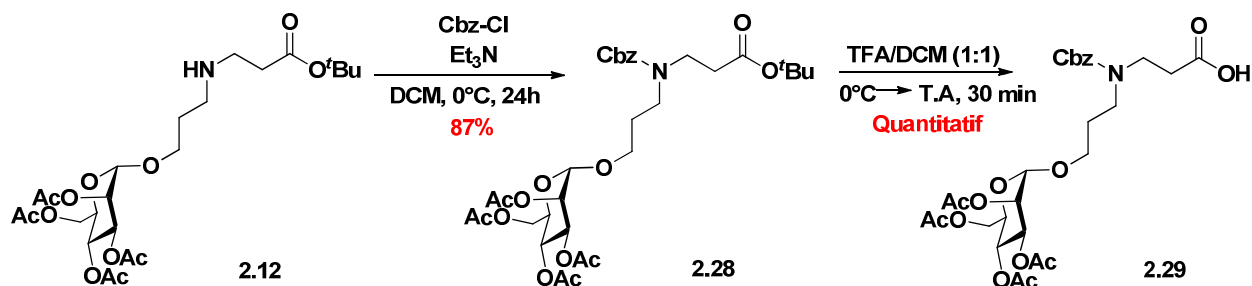


Schéma 2.18: Formation du monomère acide mannose **2.29**.

A ce stade, une optimisation de la réaction de couplage peptidique entre les deux monomères **2.12** et **2.29** a été effectuée où nous avons fait varier l'agent de couplage, la base et le solvant.²⁰³ Nous avons ainsi utilisé:

- Le couple EDCI/ HOBt sans ajout de base. L'EDCI est un agent de couplage de la famille des carbodiimides qui permet d'activer l'acide en composé O-acyl-isourée très réactif. L'ajout de l'HOBt permet de transformer ce composé en ester moins réactif, afin d'éviter une racémisation des centres stéréogènes dans le cas de peptides.
- Le réactif de Ghosez²⁰⁴ [Me₂C=C(Cl)NMe₂] avec la pyridine qui permettent de transformer l'acide en chlorure d'acyle, très réactif.
- Le chloroformiate d'isobutyle (IBCF)²⁰⁵ en présence de tributylamine qui impliquent la formation d'un anhydride mixte intermédiaire.
- PyBroP (agent de couplage type phosphonium) avec de la DIPEA. Ces conditions sont très utilisées pour effectuer des couplages peptidiques en présence d'amines encombrées en évitant une racémisation des centres stéréogènes.^{206,207} L'activation de l'acide passe par la formation d'un sel d'acyloxyphosphonium.

²⁰³ Han, S. Y.; Kim, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.

²⁰⁴ Zhang, H.; Curran, D. P. A Short Total of (±)-Epimeloscine and (±)-Meloscine Enabled by a Cascade Radical Annulation of a Divinylcyclopropane. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 10376-10378.

²⁰⁵ Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradinaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sauser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes: (Strept)avidin as Host for Enantioselective Hydrogenation by Achiral Biotinylated Rhodium - Diphosphine Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 14411-14418.

²⁰⁶ Coste, J.; Frérot, E.; Jouin, P. Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium salts: Mechanism and Fields of Application. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 2437-2446.

²⁰⁷ Frérot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M. N.; Jouin, P. PyBOP® and PyBroP: Two Reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, Aib. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259-270.

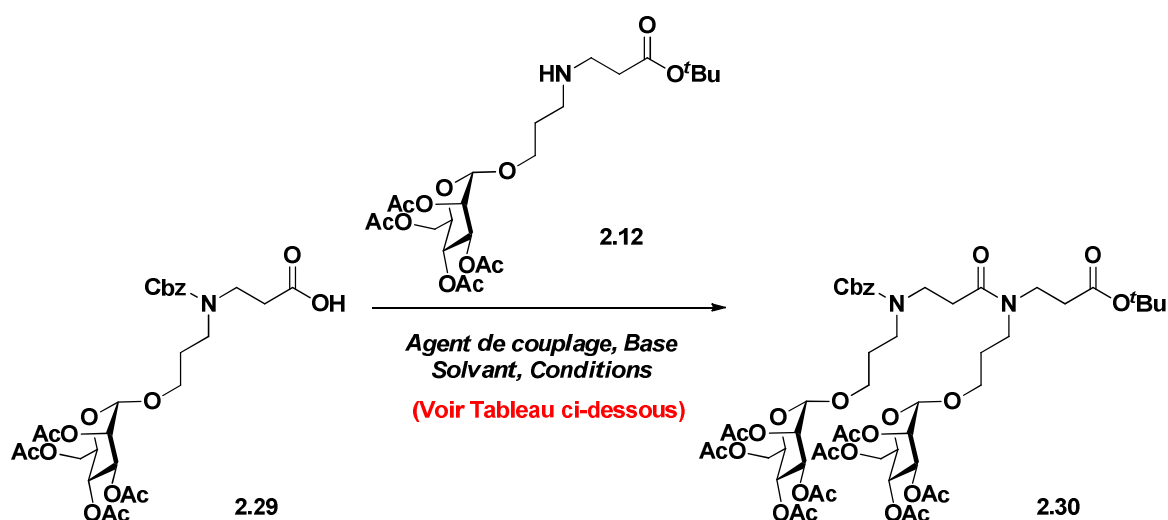
- HATU (agent de couplage de type uronium) en présence de DIPEA. Dans le groupe, ces conditions ont notamment été utilisées pour macrocycliser des β -peptoides.¹⁶⁰

L'ensemble des conditions et des résultats sont présentés dans le tableau 2.4. Comme ce fut le cas pour la méthode submonomère, tous nos essais ont été réalisés en limitant la consommation de chaque glycoside partenaire (1 éq pour chaque monomère).

Il est reconnu que les réactions de couplage peptidique sont beaucoup moins efficaces au départ d'amine secondaire du fait de leur faible réactivité.²⁰⁸ Ce caractère prend toute son importance dans le domaine des peptoides. En effet, l'amine terminale engagée dans la réaction de couplage est une amine secondaire. D'autre part, l'encombrement stérique du peptotide peut, dans certains cas, avoir un effet significatif sur l'avancement de la réaction de couplage. Dans notre cas, ces deux facteurs, amine secondaire et encombrement stérique (présence des sucres), sont réunis, ce qui peut expliquer l'obtention de certains rendements relativement moyens pour les essais 1 à 4. De plus, lors de l'utilisation du réactif de Ghosez (essai 2), la réactivité importante de l'acide activé en chlorure d'acyle peut être à l'origine de réactions secondaires.

Néanmoins, des résultats plus encourageants ont été obtenus avec le couple HATU/DIPEA (essais 5 à 7) et plus particulièrement dans le mélange DCM/DMF (80:20). Partis de ce constat, nous avons décidé d'effectuer un dernier essai, en reprenant les conditions précédentes mais cette fois-ci en augmentant les quantités en HATU (2 éq) ainsi qu'en DIPEA (2,5 éq) et en modifiant légèrement les proportions du mélange DCM/DMF (70:30). Le β -dipeptotide O-mannosylé **2.30** est alors formé avec un rendement de 92%. Grâce à ce 8^{ème} essai, nous avons mis en évidence les conditions optimales pour nos prochains couplages peptidiques.

²⁰⁸ Fara, M. A.; Díaz-Mochón J. J.; Bradley, M. Microwave-assisted coupling with DIC/HOBt for the synthesis of difficult peptoids and fluorescent labelled peptides - a gentle heat goes a long way. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 1011-1014.



Essais	Agents de couplage	Bases	Solvants	Conditions	Rendements ^a
1	EDCI.HCl (1,2 éq)/ HOBT.H ₂ O (1,2 éq)	-	DCM	T.A, 45h	35%
2	Réactif de Ghosez (1,5 éq)	Pyridine (3 éq)	DCM	T.A, 22h	30%
3	IBCF (1,2 éq)	N(Bu) ₃ (1,2 éq)	DMF	0°C, 16h	50%
4	PyBroP (1,5 éq)	DIPEA (4 éq)	DCM	T.A, 13h	55%
5	HATU (1,2 éq)	DIPEA (1,2 éq)	DCM	T.A, 24h	62%
6	HATU (1,5 éq)	DIPEA (1,5 éq)	DMF	T.A, 13h	58%
7	HATU (1,2 éq)	DIPEA (1,2 éq)	DCM/DMF (80:20)	T.A, 40h	65%
8	HATU (2 éq)	DIPEA (2,5 éq)	DCM/DMF (70:30)	T.A, 20h	92%

^a Rendements en β -dipeptide O-mannosylé **2.30** après purification par chromatographie flash.

Tableau 2.4: Essais d'optimisation du couplage peptidique.

L'acide **2.31** est obtenu quantitativement après traitement du dimère **2.30** par du TFA dans le DCM pendant 30 min, à température ambiante (Schéma 2.19). Il est utilisé directement sans purification préalable pour le couplage peptidique avec le monomère amine mannose **2.12** en utilisant les conditions optimales définies ci-dessus (Tableau 2.4 - Essai 8). Le β -tripeptide O-mannosylé **2.32** est formé avec un rendement de 80%.

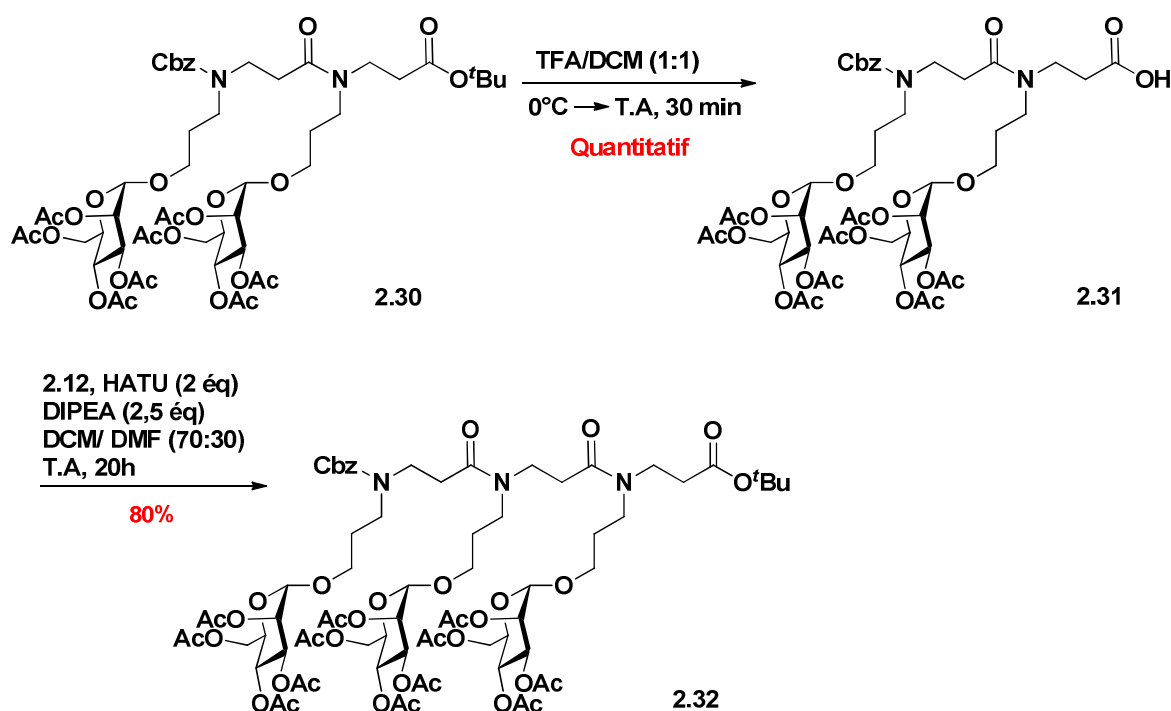


Schéma 2.19: Synthèse du trimère 2.32.

L'élimination du groupement carboxybenzyle (Cbz) du glycoconjugué **2.32** est réalisée par hydrogénolyse. Les premiers essais ont été effectués dans l'AcOEt en présence de Palladium sur charbon à 10% (10% à 20% en masse par rapport à la quantité de glycoconjugué **2.32**) et de dihydrogène (4 bar), à température ambiante. Néanmoins, certaines difficultés ont été rencontrées concernant, notamment, les vitesses de réaction. En effet, nous avons constaté que les avancements étaient très lents, malgré l'ajout, dans la plupart des cas, d'une quantité supplémentaire (au moins 10%) en catalyseur. Nous avons également observé une dégradation croissante du milieu (augmentation du nombre d'impureté) au fur et à mesure du temps. Ainsi, en fonction des essais réalisés, les temps de réaction pouvaient atteindre 6 jours avec des rendements qui oscillaient entre 62% et 65%.

Afin d'accélérer l'avancement de la réaction et donc améliorer l'efficacité de l'hydrogénolyse, nous avons décidé de rajouter de l'acide acétique glacial comme source de protons. Nous avons alors fait réagir le glycoconjugué **2.32** (Schéma 2.20) dans l'AcOEt, en présence de Pd/C (20% en masse) et d'acide acétique glacial (0,6 % par rapport au volume d'AcOEt).

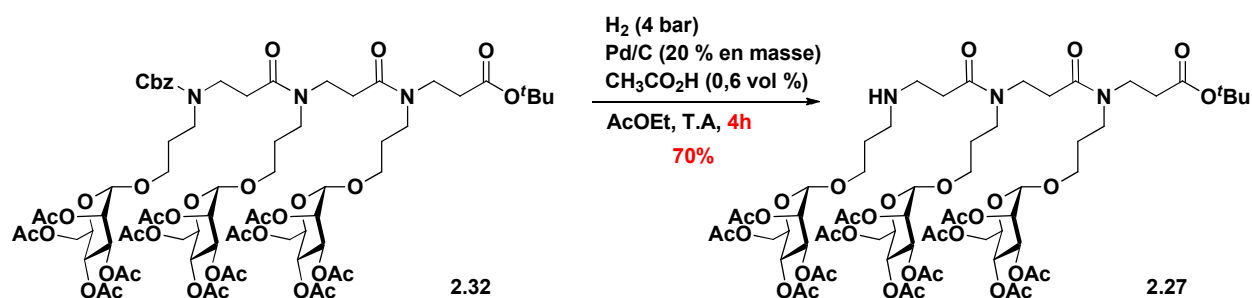


Schéma 2.20: Synthèse du trimère Mannose 2.27 par hydrogénolyse.

Dans ces conditions, le β -tripeptoïde *O*-mannosylé **2.27** souhaité est obtenu avec un rendement de 70% au bout de seulement 4h.

2. Application à la synthèse des glycoconjugués *O*-GalNAc

Désormais, il nous est possible d'employer l'ensemble de cette stratégie réactionnelle pour la synthèse du β -tripeptoïde *O*-GalNAc **2.38**. Les conditions utilisées, ici, sont donc identiques à celles mises en place à partir des glycosides dérivés du mannose. Comme précédemment, l'amine du monomère GalNAc **2.13** est, au départ, protégée par un groupement carboxybenzyle et le glycoside **2.33** est synthétisé avec un rendement de 80% (Schéma 2.21).

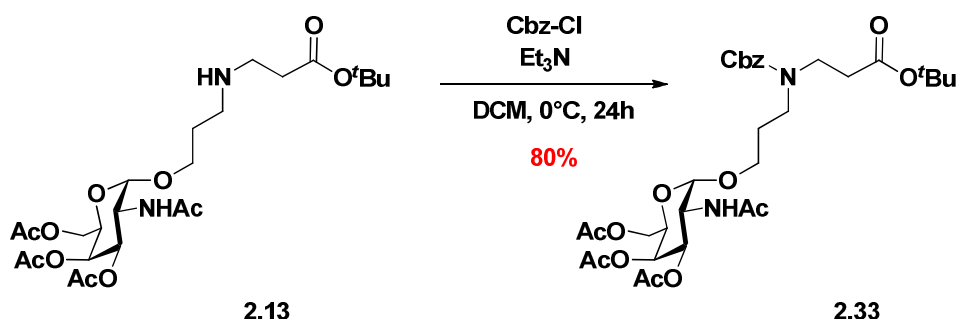


Schéma 2.21: Obtention du glycoside 2.33.

Le monomère acide GalNAc **2.34** ainsi que le dimère acide **2.36** sont formés quantitativement. Ils sont directement engagés l'un et l'autre, sans purification, dans des étapes de couplage peptidique (Schéma 2.22). Pour ce faire, nous avons utilisé les conditions optimales définies auparavant, à savoir: HATU (2 éq), DIPEA (2,5 éq), DCM/DMF (70:30), 1 éq pour chaque glycoside, le tout à température ambiante pendant 20h. Nous obtenons, dans un premier temps, le dimère **2.35** avec un rendement de 80%. Malheureusement, après purification par chromatographie flash sur gel de silice, le trimère **2.37** attendu n'est seulement obtenu qu'avec un rendement de 30%. Pour ce dernier couplage, nous avons également isolé un autre composé en

quantité majoritaire. L'analyse par RMN (^1H et ^{13}C) et par HR-MS semble révéler la présence d'un β -dipeptide *O*-GalNAc présentant une fonction ester de méthyle à l'extrémité *C*-terminale. Nous pensions, au départ, à une contamination du milieu par du méthanol. Pour s'assurer qu'une erreur de manipulation ne s'était pas produite, nous avons refait un autre essai de couplage dans les mêmes conditions. Néanmoins, à la suite de ce nouvel essai, les mêmes résultats ont été obtenus. Faute de temps, nous n'avons pas pu apporter une solution pour surmonter ce problème.

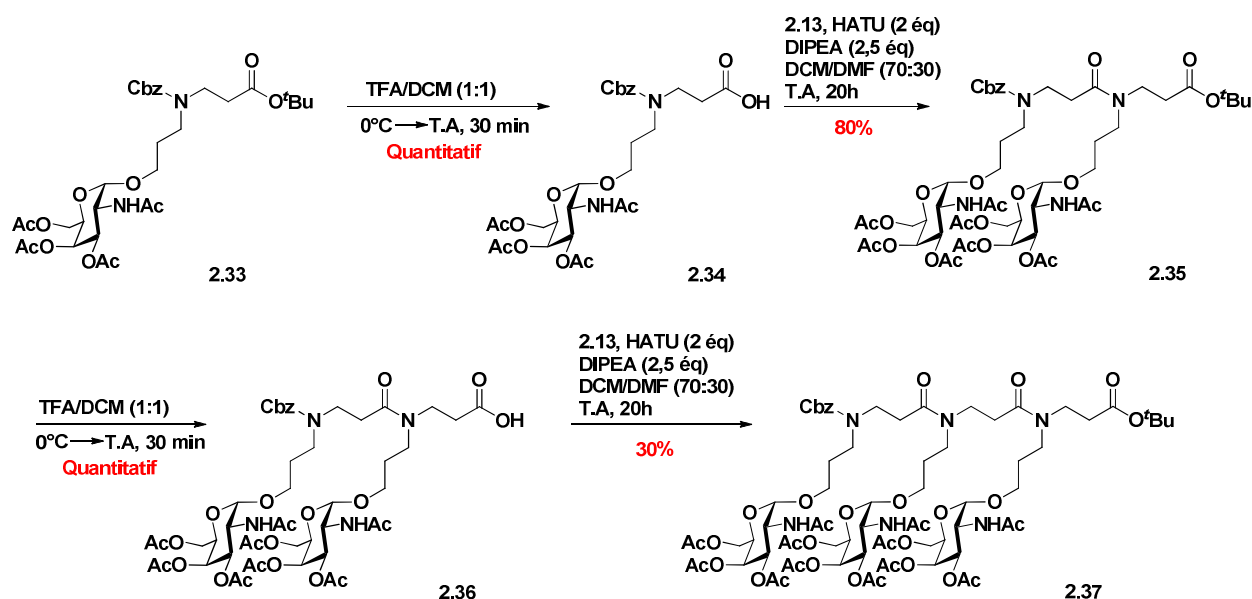


Schéma 2.22: Couplages peptidiques et formation du glycoconjugué 2.37.

Enfin, nous avons utilisé les conditions optimales d'hydrogénolyse mises en place auparavant (dihydrogène (4 bar), Pd/C (20 % en masse), acide acétique glacial (0,6 vol %), acétate d'éthyle, température ambiante) dans le but de synthétiser le β -tripeptide *O*-GalNAc 2.38 souhaité en 4h avec un rendement de 71% (Schéma 2.23).

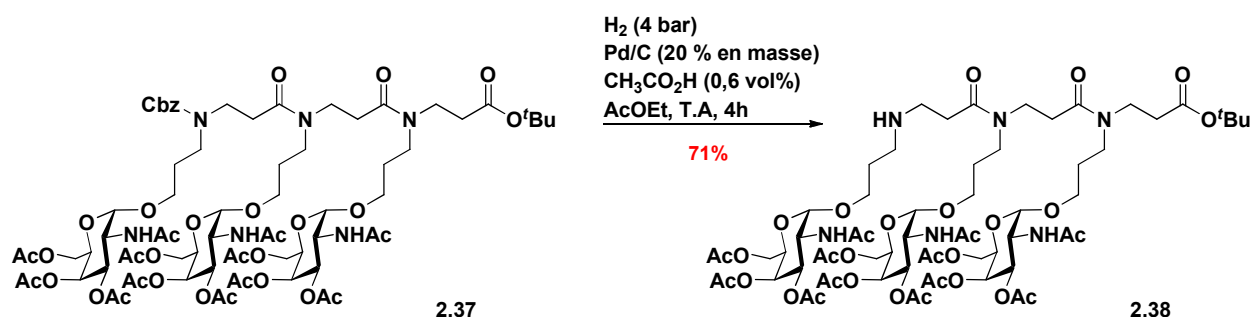


Schéma 2.23: Hydrogénolyse et synthèse du trimère GalNAc 2.38.

3. Déprotection des unités saccharidiques

Une fois les plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées **2.27** et **2.38** en notre possession, il nous était alors possible de déprotéger les sucres greffés. Les raisons, pour lesquelles nous avons décidé de réaliser cette opération sont les suivantes:

- La possibilité de pouvoir utiliser ces plateformes glycoconjuguées pour les tests biologiques sachant qu'elles font parti intégrante des édifices candidats vaccins.
- La possibilité de pouvoir utiliser une méthode qui pourra être adaptée à la déprotection de sucres présents sur des structures plus complexes (notamment les structures avec l'agoniste du récepteur Toll7 - Voir **chapitre III**).

Pour effectuer cette déprotection des sucres, nous avons employé les conditions de désacétylation de Zemplén (Schéma 2.24):

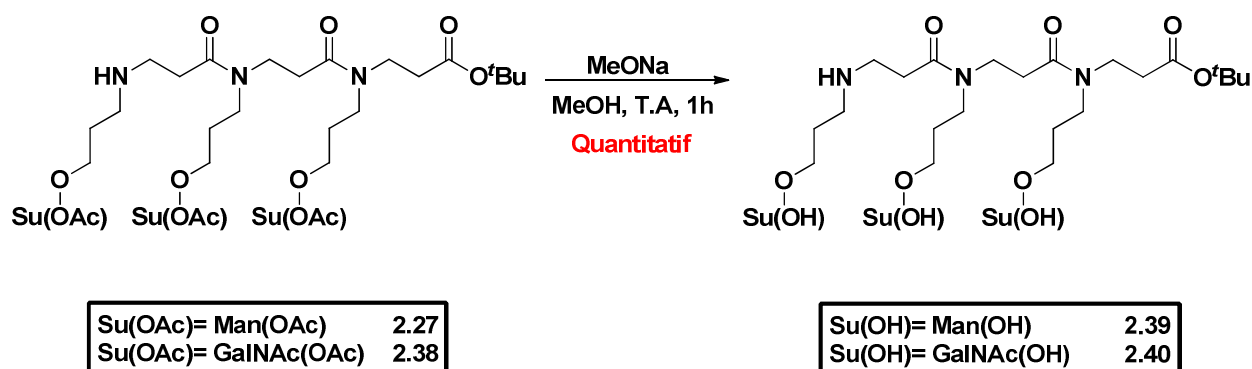


Schéma 2.24: Désacétylation des sucres.

Ces conditions impliquent de faire réagir les plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées dérivées du mannose **2.27** ou du GalNAc **2.38** avec une quantité catalytique en méthanolate de sodium (Na/MeOH) dans du MeOH anhydre. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1h à température ambiante. Nous obtenons alors quantitativement les glycoconjugués **2.39** et **2.40**.

4. Conclusion de l'étude

L'objectif de cette étude était d'appliquer la méthode monomère en solution à la synthèse des plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées. Pour ce faire, une optimisation des conditions de couplage peptidique a été réalisée pour laquelle nous avons utilisé différents agents de couplage, différentes bases et différents solvants. Nous avons ainsi réussi à mettre en place une méthode

monomère efficace permettant de synthétiser, dans un premier temps, la plateforme *O*-mannosylée **2.32** à partir du monomère amine **2.12**. Ces conditions optimales ont, par la suite, été transposées avec succès à la synthèse de l'homologue *O*-GalNAc **2.37** à partir du monomère **2.13**. Néanmoins, l'obtention de ce dernier s'est avérée plus complexe que nous l'avions escompté. En effet, la formation majoritaire d'un sous produit indésirable reste encore à ce jour sans explication. Malgré tout, après optimisation des conditions d'élimination du groupement Cbz des plateformes peptoïdes et après l'utilisation efficiente des conditions de Zemplén pour la désacétylation des sucres, nous sommes finalement parvenu à synthétiser les glycoconjugués **2.39** et **2.40**. Partant du D-mannose et du D-GalNAc, ces glycoconjugués ont pu être formés en 13 étapes avec des rendements globaux, respectivement de 14% et de 8%.

IV. Accès aux plateformes β -tripeptoïdes *S*-glycosylées

Les composés *S*-glycoconjugués sont de bons analogues des composés *O*-glycoconjugués naturels puisque ces deux liens glycosidiques ont une conformation spatiale très similaire.²⁰⁹ Cependant, l'utilisation de composés *S*-glycoconjugués présentent un avantage supplémentaire. En effet, la liaison thioglycosidique montre une sensibilité plus faible à l'hydrolyse enzymatique que la liaison *O*-glycosidique:²¹⁰ les glycohydrolases utilisent une catalyse acide pour assister la coupure de la liaison, or le soufre est beaucoup moins basique que l'oxygène.

Dans cette partie, nous présenterons la synthèse des plateformes β -tripeptoïdes *S*- α -mannose et *S*- α -GalNAc (Figure 2.21).

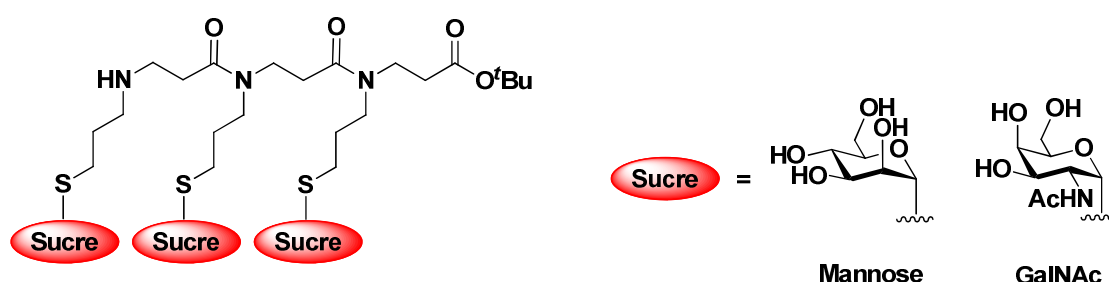


Figure 2.21: Structure générale des plateformes *S*-glycoconjuguées à synthétiser.

²⁰⁹ Montero, E.; García - Herrero, A.; Asencio, J. L.; Hirai, K.; Ogawa, S.; Santoyo - González, F.; Cañada, F. J.; Jiménez - Barbero, J. The Conformational Behaviour of Non - Hydrolyzable Lactose Analogues: The Thioglycoside, Carbaglycoside, and Carba - Iminoglycoside Cases. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 1945-1952.

²¹⁰ Yip, V. L. Y.; Withers, S. G. Family 4 Glycosidases Carry Out Efficient Hydrolysis of Thioglycosides by an α,β - Elimination Mechanism. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 6179-6182.

Les sucres ont été greffés sur la plateforme par une réaction de couplage photochimique thiol-ène ou TEC récemment mise au point dans le groupe pour la synthèse de S-glycopeptoïdes. C'est une réaction de couplage radicalaire entre un thiol et un alcène qui peut également être activée par voie thermique. Le produit formé est un thioéther de type anti-Markovnikov^{211,212} selon le mécanisme présenté dans la figure 2.22. Cette réaction a été décrite il y a plus d'un siècle. Néanmoins, le caractère "click" de la version photochimique de la TEC n'a émergé que récemment et le terme "thio-click" a été introduit en 2007 par Gress et al.²¹³ Le caractère "click" de cette réaction, repose sur son efficacité, sa régiospécificité, sa tolérance pour une grande variété de groupements fonctionnels, l'utilisation possible de l'eau comme solvant et le fait qu'elle n'est pas sensible à la présence d'oxygène.^{214,215} La TEC répond également au principe d'économie d'atome.

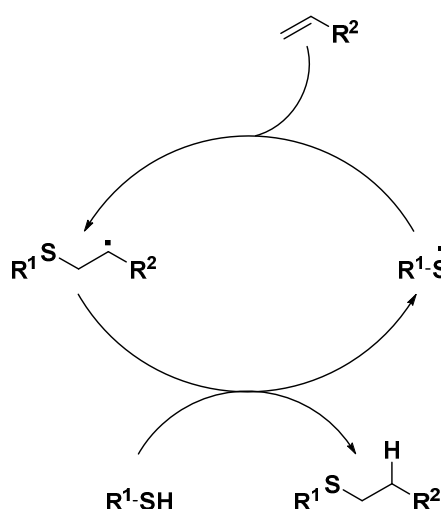


Figure 2.22: Réaction radicalaire du couplage thiol-ène.

Pour obtenir nos composés S-glycoconjugués par cette méthode, nous avons synthétisé, au préalable, les composés α -thiomannopyranose **2.41** et α -thioGalNAc **2.42** (Figure 2.23). Ensuite, nous avons préparé, à l'aide de la méthode submonomère en solution, la plateforme β -tripeptoïde

²¹¹ Griesbaum, K. Problems and Possibilities of the Free - Radical Addition of Thiols to Unsaturated Compounds. *Angewandte Chemie International Edition* **1970**, 9, 273-287.

²¹² Köhn, M.; Benito, J. M.; Ortiz, Mellet, C.; Lindhorst, T. K.; García Fernández, J. M. Functional Evaluation of Carbohydrate-Centred Glycoclusters by Enzyme-Linked Lectin Assay: Ligands for Concanavalin A. *ChemBioChem* **2004**, 5, 771-777.

²¹³ Gress, A.; Völken, A.; Schaald, H. Thio-Click Modification of Poly[2-(3-butenyl)-2-oxazoline]. *Macromolecules* **2007**, 40, 7928-7933.

²¹⁴ Dondoni, A. The Emergence of Thiol-Ene Coupling as a Click Process for Materials and Bioorganic Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, 8995-8997.

²¹⁵ Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, 1355-1387.

2.43 présentant des chaînes latérales de type allyle. La dérivation des chaînes latérales allyles grâce au couplage thiol-ène, conduit à la formation d'un lien thioéther.

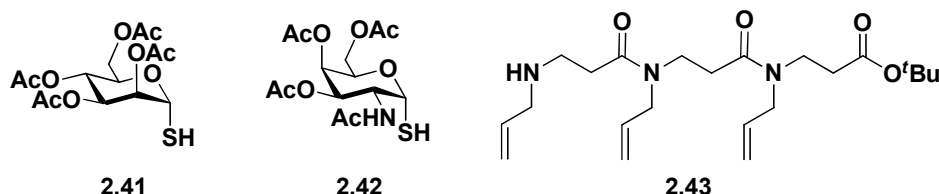


Figure 2.23: Structures préparées au préalable avant de réaliser la TEC.

A. Synthèse des α -thiosucres peracétylés

1. Synthèse de l' α -thiomannopyranose 2.41

Pour accéder au composé **2.41**, nous nous sommes inspirés de conditions de réaction décrites dans la littérature²¹⁶ (Schéma 2.25).

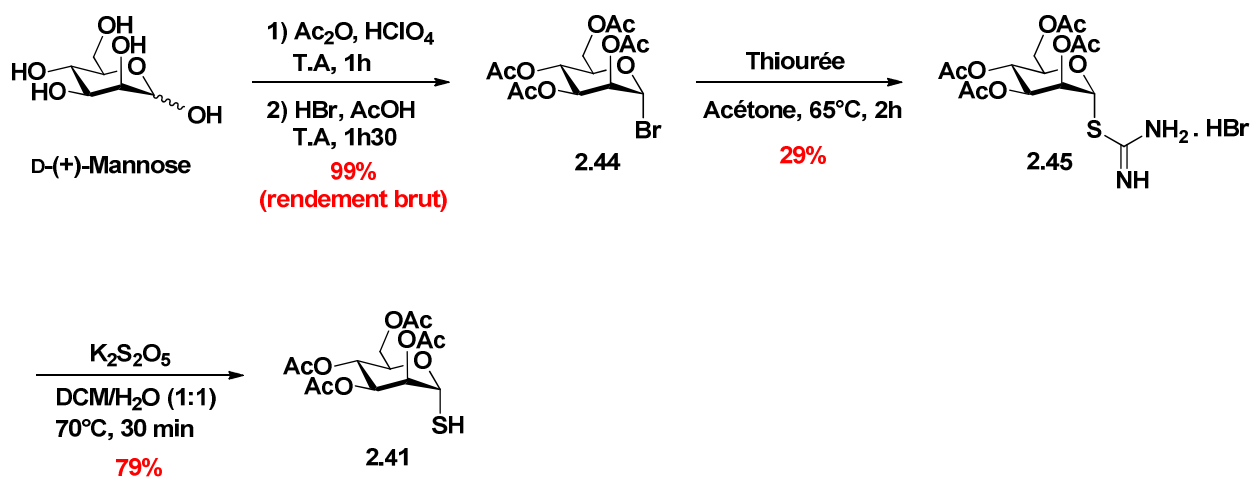


Schéma 2.25: Accès à l' α -thiomannopyranose peracétylé 2.41.

Le D-mannose est, dans un premier temps, peracétylé en présence d'anhydride acétique et d'une solution d'acide perchlorique (70% dans l'eau) et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1h en maintenant la température en dessous de 40°C. Le produit brute formé est directement engagé dans une étape de bromation par traitement avec une solution d'HBr à 33%

²¹⁶ Durette, P.; Shen, T. Y. Insulin-like, and insulin-antagonistic, carbohydrate derivatives. The synthesis of aryl and aralkyl D-mannopyranosides and 1-thio-D-mannopyranosides. *Carbohydrate research* **1980**, 81, 261-274.

dans l'acide acétique.²¹⁷ Le suivi CCM de la réaction a mis en évidence la présence d'un produit majoritaire. Les signaux obtenus par analyses RMN (^1H et ^{13}C) de ce produit sont bien en rapport avec le composé bromé **2.44** attendu. Due à son instabilité, ce composé bromé a été directement engagé dans l'étape suivante de substitution par la thiourée. Celle-ci est réalisée dans l'acétone anhydre à 65°C pendant 2h.²¹⁸ Après purification par chromatographie sur gel de silice, le bromure de (2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-mannopyranosyl)-1-isothiuronium **2.45** est obtenu avec un rendement de seulement 29%. La formation de cet anomère α est gouvernée par l'assistance anchimérique effectuée par le groupement acétate en position 2. Ceci est confirmé par la faible valeur de la constante de couplage entre les protons H_1 et H_2 ($^3J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 1,4 \text{ Hz}$).

L'hydrolyse du bromure d'isothiuronium **2.45** en présence de métabisulfite de potassium dans un mélange DCM/ H_2O (1:1), pendant 30 min à 70°C,²¹⁸ permet d'obtenir l' α -thiomannose peracétylé **2.41** souhaité avec un rendement de 79%. La faible valeur de la constante de couplage entre les protons H_1 et H_2 ($^3J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 0,7 \text{ Hz}$) confirme bien la configuration α du carbone anomérique. Par ailleurs, lors de cette réaction, afin d'éviter une oxydation du soufre anomère, il était préférable de dégazer le mélange DCM/ H_2O sous argon pour éliminer le dioxygène.

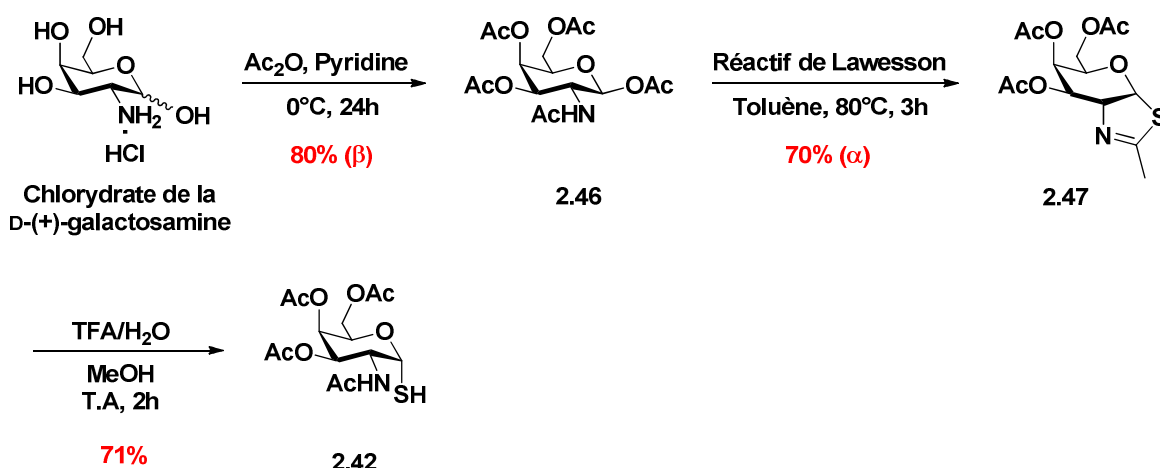
2. Synthèse de l' α -thioGalNAc peracétylé **2.42**

Par hypothèse, nous avons pensé que les conditions réactionnelles définies ci-dessus ne pouvaient pas être mises en place pour synthétiser l' α -thioGalNAc peracétylé **2.42** à partir du D-GalNAc. En effet, dans ces conditions de bromation, il est plus courant de former majoritairement, par effet anomère, un composé bromé de configuration α . Ceci aurait entraîné une addition de la thiourée en position β (substitution nucléophile ou assistance anchimérique du groupement acétamide). Au final, le carbone anomérique aurait présenté une fonction thiol en β et non en α comme espéré.

Nous avons alors décidé d'utiliser une autre méthode décrite dans la littérature réalisée, cette fois-ci, à partir du chlorydrate de la D-galactosamine. De plus, cette méthode comporte moins d'étape (trois en tout) que la précédente méthode, ce qui nous permet d'accéder plus rapidement à l' α -thioGalNAc acétylé **2.42** attendu (Schéma 2.26).

²¹⁷ Kozikowski, A. P.; Lee, J. A Synthetic Approach to the Cis-Fused Marine Pyranopyrans, (3E)- and (3Z)-Dactomelyne. X-ray Structure of a Rare Organomercurial. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 863-870.

²¹⁸ Zhang, Q.; Lebl, T.; Kulczynska, A.; Botting, N. P. The synthesis of novel hexa- ^{13}C -labelled glucosinolates from [$^{13}\text{C}_6$]-D-glucose. *Tetrahedron* **2009**, 65, 4871-4876.

Schéma 2.26: Accès à l' α -thioGalNAc acétylé **2.42**.

Le chlorure de la D-galactosamine est peracétylé en présence d'anhydride acétique et de pyridine à 0°C pendant 24h.²¹⁹ Après concentration du milieu, le solide obtenu est recristallisé. Le 2-acétamido-2-déoxy-1,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-galactopyranoside **2.46** est ainsi obtenu avec un rendement de 80%. La synthèse de l'anomère β est confirmée par la valeur importante de la constante de couplage entre les protons H_1 et H_2 ($^3J_{\text{H}_1-\text{H}_2} = 8,8 \text{ Hz}$, caractéristique d'un couplage H_1 - H_2 axial-axial).

Le composé **2.46** est ensuite traité par le réactif de Lawesson dans du toluène à 80°C pendant 3h. Ce réactif permet la conversion de l'acétamide en thioamide.^{220,221} L'addition de l'atome de soufre du thiocarbonyle sur le carbone anomérique engendre alors la formation d'un cycle thiazoline. Après purification par chromatographie sur gel de silice, le composé **2.47** est obtenu avec un rendement de 70%.

Enfin, le cycle thiazoline du composé **2.47** est hydrolysé en présence d'un mélange TFA/ H_2O (1:1) dans du MeOH.^{220,222} Lors de cette hydrolyse, c'est la liaison C-S de l'imine qui est rompue et non la liaison C-S anomérique. On obtient donc le 2-acétamido-2-déoxy-1-thio-3,4,6-tri-O-acétyl- α -D-galactopyranose **2.42** souhaité avec un rendement de 71%.

²¹⁹ Deng, S.; Gangadharmath, U.; Chang, C-W. T. Sonochemistry: A Powerful Way of Enhancing the Efficiency of Carbohydrate Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 5179-5185.

²²⁰ Knapp, S.; Myers, D. S. Synthesis of α -GalNAc Thioconjugates from an α -GalNAc Mercaptan. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 2995-2999.

²²¹ Knapp, S.; Vocadlo, D.; Gao, Z.; Kirk, B.; Lou, J.; Withers, S. G. NAG-thiazoline, An N-Acetyl- β -hexosaminidase Inhibitor That Implicates Acetamido Participation. *Journal of American Chemical Society* **1996**, 118, 6804-6805.

²²² Knapp, S.; Myers, D. S. α -GlcNAc Thioconjugates. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 3636-3638.

B. Accès à la plateforme β -tripeptoïde N-allyle **2.43**

Pour synthétiser la plateforme β -tripeptoïde **2.43** présentant des chaînes latérales de type allyle, nous avons utilisé la méthode submonomère en solution. Comme nous l'avons précisé précédemment, il s'agit d'une méthode itérative en deux étapes: le squelette β -peptoïde est allongé par acylation avec le chlorure d'acryloyle puis la chaîne latérale est introduite par une réaction d'aza-Michael d'une amine primaire sur l'intermédiaire acrylamide. Dans notre cas, il était nécessaire de répéter deux itérations afin d'obtenir la plateforme β -tripeptoïde **2.43** attendue (Schéma 2.27).

Des travaux d'optimisation de cette méthode en solution, ont été accomplis dans l'équipe, notamment en terme de rapidité et d'économie de purification. La synthèse en solution permet, en outre, de préparer des quantités importantes de produits. Nous avons, ainsi, utilisé les conditions optimales suivantes:¹⁴⁸

- Pour l'étape d'acylation: chlorure d'acryloyle (1,2 éq), Et₃N (2,2 éq), AcOEt, 0°C, 1h.
- Pour l'étape d'aza-Michael: allylamine (2 éq), MeOH, 50°C, 1 nuit.

L'utilisation de l'AcOEt comme solvant d'acylation permet une précipitation efficace des sels d'ammonium. Une simple filtration du milieu réactionnel puis évaporation du filtrat permet d'isoler les intermédiaires acrylamides avec des puretés suffisantes pour être directement engagés dans les étapes d'aza-Michael.

L'utilisation de l'allylamine, amine primaire volatile, permet son élimination par évaporation en même temps que le solvant en fin d'étape d'aza-Michael et fournit des intermédiaires amines secondaires suffisamment pures pour pouvoir continuer la synthèse sans purification.

Tous ces intermédiaires ont été isolés par filtration et/ou par concentration du milieu réactionnel sans purifications intermédiaires par chromatographie sur gel de silice. Un suivi CCM est réalisé à chaque étape pour vérifier la disparition des intermédiaires acrylamides ou des amines secondaires. Malgré tout, afin d'éliminer certaines impuretés résiduelles, visibles en CCM, une purification par chromatographie a été nécessaire à la dernière étape.

En outre, l'élimination presque totale des sels d'ammonium, responsables de la formation de sous-produits indésirables limitant alors l'efficacité de la réaction d'acylation, l'utilisation d'un

excès de triéthylamine ainsi qu'un excès d'amine primaire volatile, sont des facteurs influençant très favorablement le rendement global.

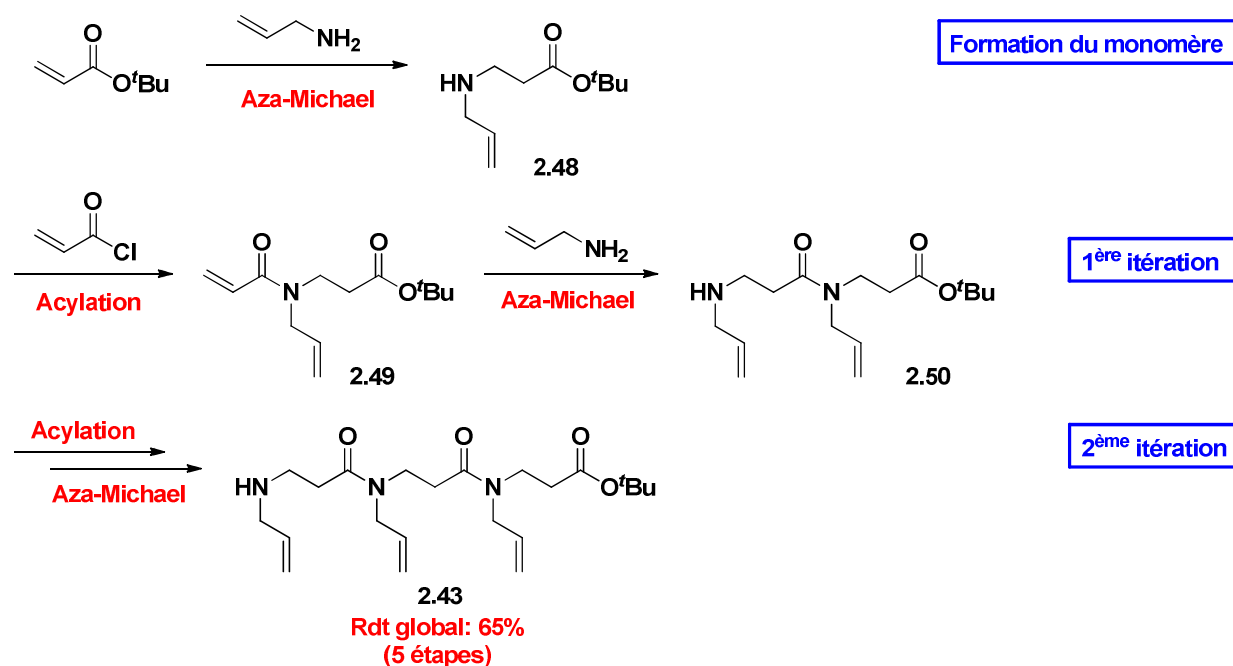


Schéma 2.27: Synthèse du β -tripeptoïde **2.43** suivant la méthode submonomère en solution.

Grâce à toutes ces optimisations, nous avons donc pu constater que le trimère β -peptoïde **2.43** pouvait être isolé, après une seule purification par chromatographie, en 5 étapes avec un rendement global de 65%.

Conclusion

Nous avons donc réussi à synthétiser les composés α -thiomannopyranose **2.41** et α -thioGalNAc **2.42** ainsi que la plateforme β -tripeptoïde **2.43** présentant des chaînes latérales de type allyle. A ce stade, il nous est alors possible de pouvoir post-fonctionnaliser ces chaînes latérales par couplage thiol-ène afin de former les composés S-glycosylés souhaités.

C. Ligation multivalente par TEC

1. Etudes bibliographiques

Dans la littérature, différentes conditions réactionnelles sont décrites pour effectuer efficacement le couplage radicalaire entre un thiol et un alcène par initiation photochimique. La réaction peut être initiée par irradiation avec une lampe UV visible et avec un filtre quartz qui laisse passer les rayons UV de haute énergie. Cependant, certains groupements étant sensibles dans ces conditions,²²³ l'irradiation à travers un filtre Pyrex (qui ne laisse passer que les longueurs d'onde supérieures à 300 nm) en présence d'un photoinitiateur est souvent préférée. Le photoinitiateur le plus couramment employé est la 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DPAP).

Cette réaction a été réalisée de façon efficace dans l'eau avec des thiosucres non protégés dans le but d'obtenir des protéines S-glycosylées.²²⁴ Dans l'équipe, une approche directe d'accès à des glycoclusters peptoïdes par ligation multivalente de type TEC, a également été développée dans l'eau à partir de thiosucres non protégés. Les conditions optimales ont été mises au point à l'aide d'une plateforme β -térapeptoïde portant quatre chaînes latérales allyles et protégée à ses extrémités sous forme d'acétamide et d'ester de méthyle (Schéma 2.28).

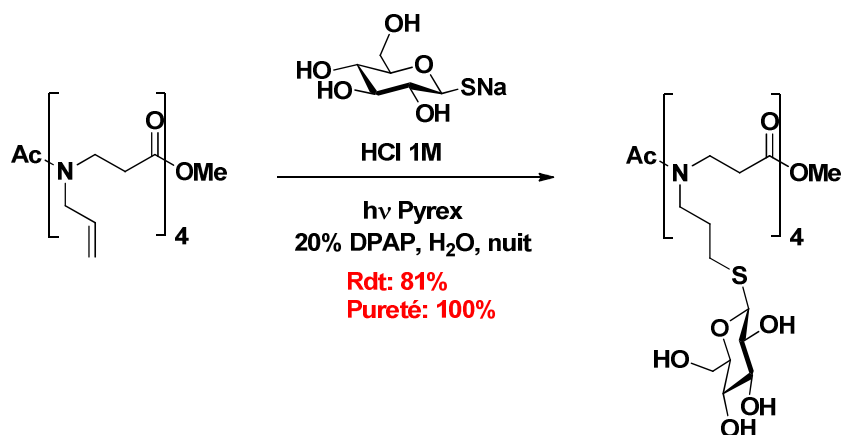


Schéma 2.28: TEC optimisée dans l'eau sur une plateforme β -peptoïde avec des thiosucres déprotégés.

²²³ Lubineau, A.; Lortat-Jacob, H.; Gavard, O.; Sarrazin, S.; Bonnaffé, D. Synthesis of Tailor-Made Glycoconjugate Mimetics of Heparan Sulfate That Bind IFN- γ in the Nanomolar Range. *Chemistry A European Journal* **2004**, 10, 4265-4282.

²²⁴ Floyd, N.; Vijayakrishnan, B.; Koeppe, J. R.; Davis, B. G. Thiyl Glycosylation of Olefinic Proteins: S-Linked Glycoconjugate Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48, 7798-7802.

Le composé 1-thio- β -D-glucose (sucre commercial sous forme de sel de sodium) a été utilisé comme sucre pour la synthèse. Pour que la réaction se réalise, il a été acidifié *in situ* par une quantité équimolaire d'HCl 1M. Un excellent rendement et une très bonne pureté ont été obtenus. Cette pureté correspond à un pourcentage de conversion de l'alcène en thioéther (ou pourcentage de couplage). Il est calculé par intégration, en RMN ^1H , des signaux résiduels des alcènes. Pour aboutir à ces bons résultats, il a été nécessaire de mettre en place certaines conditions opératoires:

- Utiliser un léger excès de thiosucre par rapport au nombre de fonctions éthyléniques présentes sur la plateforme (1,1 équivalents de sucres/alcènes).
- Utiliser 20 mol % de DPAP (par rapport à la quantité de sucre). Cette quantité est légèrement supérieure à celle définie habituellement dans la littérature (10 mol %).
- Augmenter le temps de réaction à une nuit (dans la littérature, les réactions TEC durent, de manière générale, 1h).
- Laver le milieu réactionnel brut par un solvant organique pour retirer l'excès de photoinitiateur (DPAP). La phase aqueuse est ensuite déposée sur une cartouche SPE de silice greffée C18. Le peptoïde glycoconjugué reste accroché à la phase stationnaire alors que le sucre libre peut être élué avec un volume d'eau. Le peptoïde est finalement décroché de la phase stationnaire en éluant par un seul volume de méthanol. Ces conditions permettent la purification du peptoïde S-glycoconjugué.

Il est de plus important de noter qu'aucune épimérisation des sucres en position anomérique n'a été observée au cours de cette réaction. En utilisant le 1-thio- β -D-glucose, le produit glycoconjugué formé est exclusivement sous forme β .

D'autres groupes ont réalisé ce couplage thiol-ène par initiation photochimique dans de nombreux solvants organiques en utilisant, cette fois-ci, des sucres protégés, le plus souvent, par des groupements acétates. Dans ces conditions, l'intérêt de cette réaction pour la glycosylation de peptides et de protéines a été démontré par l'équipe de Dondoni.²²⁵ Le même groupe a également montré l'efficacité de la ligation multivalente de sucres (jusqu'à huit unités) sur les plateformes de type calix[4]arène par TEC photochimique.²²⁶ Ils ont, de plus, utilisé des calix[4]arènes portant quatre alcènes sur la face supérieure et quatre alcynes sur la face inférieure qui ont été

²²⁵ Dondoni, A.; Massi, A.; Nanni, P.; Roda, A. A New Strategy for Peptide and Protein Glycosylation: Photoinduced Thiol-Ene Coupling. *Chemistry A European Journal* **2004**, *10*, 4265-4282.

²²⁶ Fiore, M.; Chambery, A.; Marra, A.; Dondoni, A. Single and dual glycoside clustering around calix[4]arene scaffolds *via* click thiol-ene coupling and azide-alkyne cycloaddition. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 3910-3913.

fonctionnalisés séquentiellement par CuAAC et par TEC. Un glycocluster présentant des sucres différents sur les deux faces du calix[4]arène a ainsi pu être obtenu (Figure 2.23).

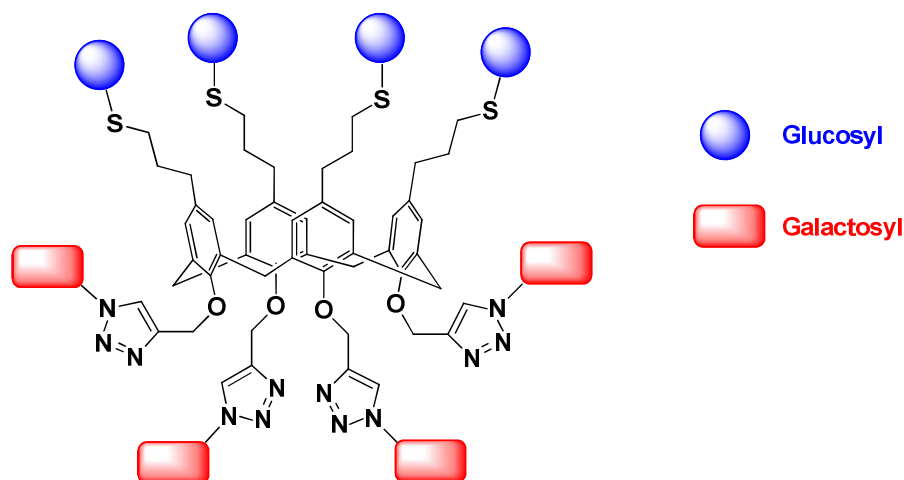


Figure 2.24: Plateforme calix[4]arène fonctionnalisée par CuAAC et TEC successivement.

Fiore et al.²²⁷ ont montré, au cours de leur étude (Schéma 2.29), que l'utilisation du DCM en particulier, permettait d'éviter la formation du principal sous-produit de cette réaction de TEC, le disulfure issu du couplage du thiol sur lui-même. Ils ont également mis en évidence qu'en augmentant le temps de réaction, elle pouvait être effectuée simplement à la lumière naturelle.

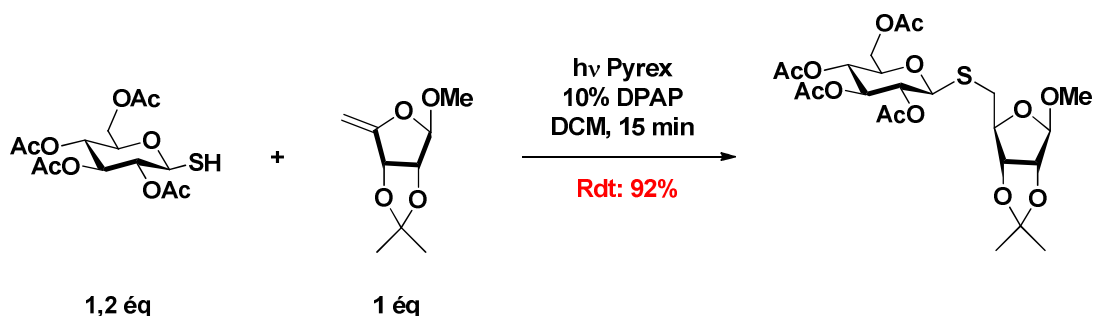


Schéma 2.29: Conditions de TEC optimisées pour le couplage de sucres protégés.

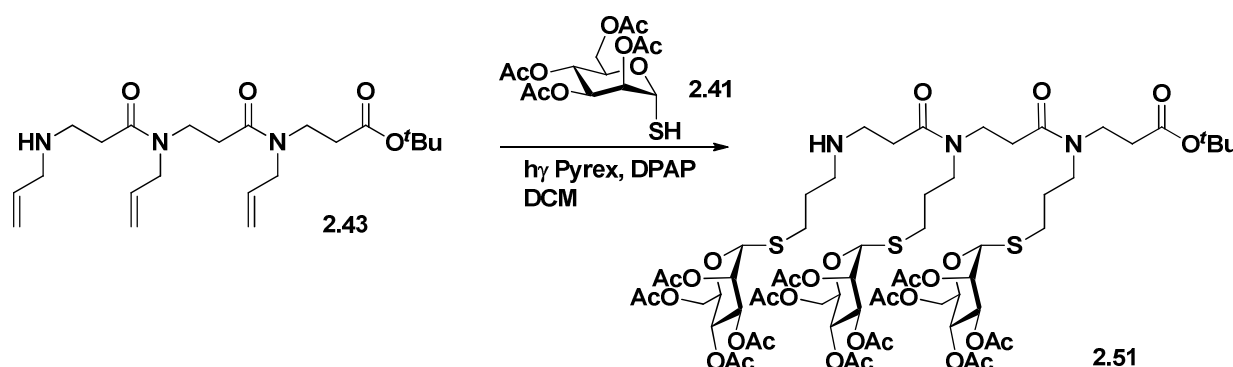
De façon générale dans la littérature, la réaction de TEC est décrite comme rapide (maximum 1h) et un excès de thiol est employé pour obtenir une conversion totale de l'alcène. De plus, la configuration du carbone anomérique des sucres est conservée, après réaction, au niveau du glycoconjugué (pas d'épimérisation).

²²⁷ Fiore, M.; Marra, A.; Dondoni, A. Photoinduced Thiol-Ene Coupling as a Click Ligation Tool for Thiodisaccharide Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74, 4422-4425.

2. Mise au point des conditions de couplage

La recherche des conditions optimales pour la ligation multivalente de thiosucres par TEC a été effectuée sur la plateforme β -tripeptoïde **2.43** portant trois chaînes latérales de type allyle avec l' α -thiomannose peracétylé **2.41**.

L'irradiation a, dans chaque cas, été menée dans du DCM à l'aide d'un filtre Pyrex et en présence de DPAP comme photosensibilisateur.²²⁷ Le dégazage et l'agitation du milieu réactionnel s'est fait par bullage d'argon dans la solution. Le DCM s'évaporant rapidement avec cette méthode, un réajustement du volume du mélange a été parfois nécessaire. Un premier essai de couplage TEC (Tableau 2.5 - Essai 1) a été réalisé avec 1 équivalent de plateforme peptoïde **2.43** pour 3 équivalents de thiosucre **2.41** (c'est-à-dire 1 équivalent pour chaque alcène présent sur la plateforme). Le DPAP est à 10% molaire par rapport à la quantité de monomère **2.41**. Après 3h de réaction, le milieu réactionnel brut est directement purifié par chromatographie sur gel de silice. Cependant, les analyses par RMN ^1H et par HR-MS ont seulement montré la présence de β -tripeptoïdes portant un ou deux sucres protégés et des sous-produits non identifiés. La conversion des alcènes de la plateforme **2.43** n'était donc pas totale. Pour remédier à ce problème, nous avons effectué un deuxième essai, où cette fois-ci, la quantité en α -thiomannose percétylé **2.41** a été augmentée (3,6 éq). Néanmoins, cette modification ne nous a pas permis d'aboutir au trimère **2.51** escompté (Tableau 2.5 - Essai 2).



Essai	Thiosucre 2.41	Peptoïde 2.43	DPAP	Temps	Observations
1	3 éq	1 éq	10% molaire	3h	Composés mono- et di-glycosylés
2	3,6 éq	1 éq	10% molaire	3h	Composés mono- et di-glycosylés

Tableau 2.5: Essais de TEC sur le composé **2.43**.

Dans l'équipe, les conditions de couplage thiol-ène avaient été mises au point sur des peptoides acétylés à l'extrémité *N*-terminale. Nous avons donc décidé d'acétyler cette même extrémité sur notre plateforme **2.43** par traitement avec du chlorure d'acétyle et de la triéthylamine, dans l'AcOEt à 0°C pendant 3h (Schéma 2.30). Le β -tripeptoïde acétylé **2.52** est formé avec un rendement de 74%. Dans un second temps, pour réaliser le couplage thiol-ène, nous avons utilisé les mêmes conditions que précédemment, c'est-à-dire: 1 équivalent de plateforme acétylée **2.52**, 3,6 équivalents de thiosucres **2.41**, 10% molaire de DPAP et du DCM comme solvant (Schéma 2.30). Après 3h de réaction, le suivi CCM a mis en évidence la présence d'un produit très majoritaire qui, après purification par chromatographie sur gel de silice, s'avère être le β -tripeptoïde **2.53** attendu. Le rendement étant de 85%. Ce résultat confirme bien le fait que la protection de l'extrémité *N*-terminale du peptoïde favorise la conversion des alcènes en thioéthers.

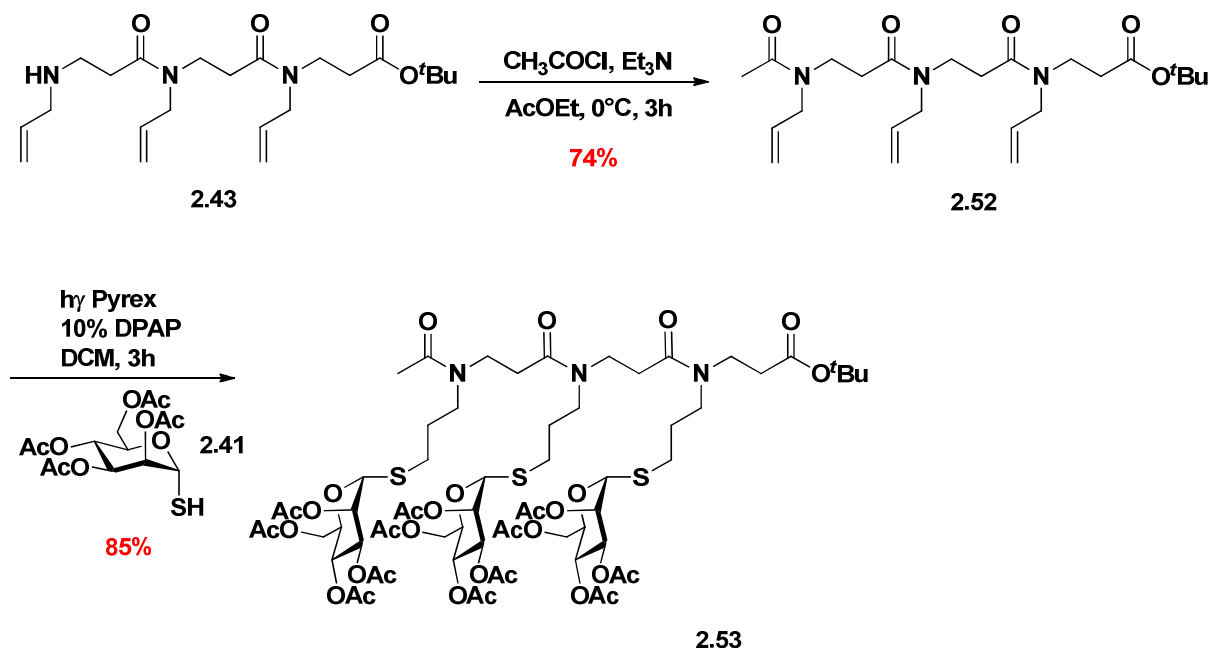
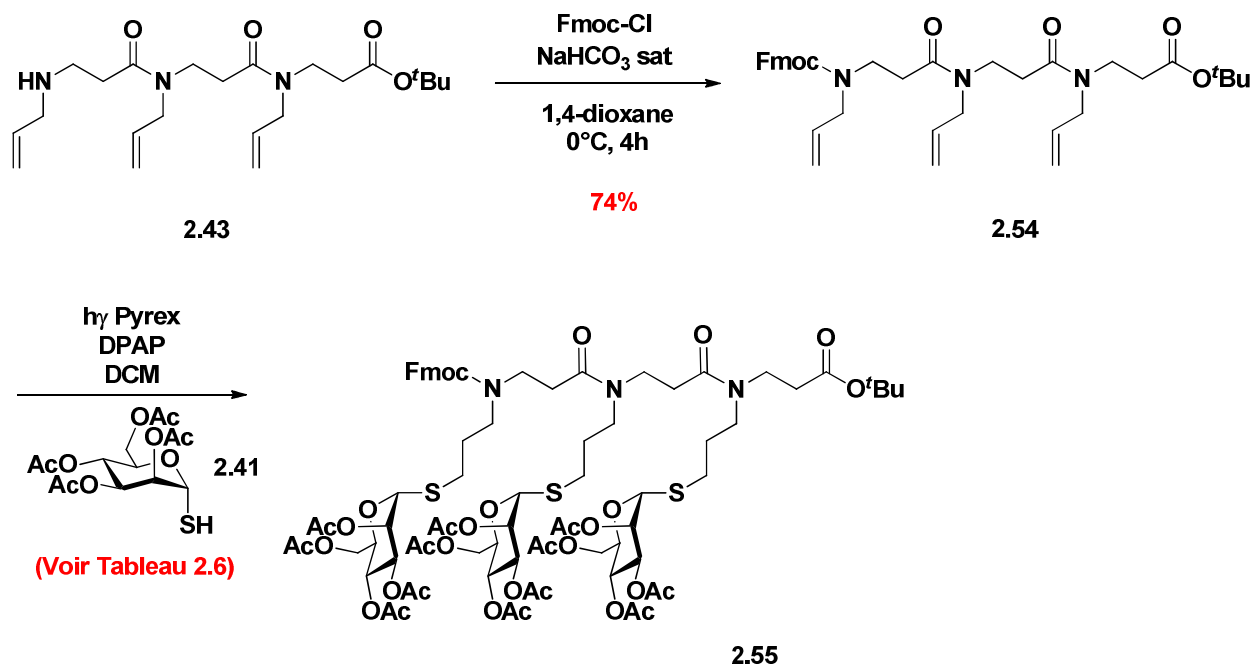


Schéma 2.30: TEC multivalente sur le β -tripeptoïde acétylé **2.52**.

Néanmoins, ce groupement acyle ne peut être enlevé alors même que la présence d'extrémités *N*-terminales libres, sur nos plateformes glycopeptoides, est primordiale pour la construction des édifices candidats vaccins. A ce stade, nous avons choisi de protéger l'extrémité *N*-terminale sous forme de Fmoc carbamate, orthogonal aux acétates et à l'ester de *tert*-butyle. De plus, les réactions de photochimie étant effectuées dans un réacteur en pyrex, ceci nous a permis d'éviter d'irradier dans une zone où le groupement Fmoc absorbe. Pour ce faire, la plateforme β -tripeptoïde **2.43** réagit en présence de Fmoc-Cl et d'une solution saturée en

hydrogénocarbonate de sodium, dans du 1,4-dioxane à 0°C pendant 4h.²²⁸ Le composé protégé par un Fmoc **2.54** est obtenu avec un rendement de 74%.



Essais	Thiosucre 2.41	Peptoïde 2.54	DPAP	Temps de réaction	Rendements
1	3,6 éq	1 éq	10% molaire	5h	Pas de trace de 2.55
2	3,6 éq	1 éq	20% molaire	7h	50%
3	4,2 éq	1 éq	30% molaire	30h	50%

Tableau 2.6: Essais de TEC sur le peptoïde **2.54**.

A partir de cette plateforme **2.54**, nous avons tout d'abord fait un premier essai de couplage en utilisant les conditions optimales définies avec la plateforme acétylée **2.52** (Tableau 2.6 - Essai 1). Après 5h d'irradiation, les produits formés sont purifiés par chromatographie sur gel de silice. Les analyses par RMN ¹H et par HR-MS ont révélé la présence de peptoïdes portant un ou deux sucres protégés. Aucune trace du composé **2.55** attendu n'a été détectée. Afin d'améliorer la conversion de l'ensemble des alcènes de la plateforme, nous avons augmenté la quantité en DPAP (20% molaire) et le temps de réaction à 7h (Tableau 2.6 - Essai 2). Grâce à ces modifications, nous avons réussi à isoler le β -tripeptoïde S-mannosylé **2.55** souhaité, avec un rendement de 50%. Un dernier essai a été effectué (Tableau 2.6 - Essai 3) où cette fois-ci nous avons augmenté de manière plus significative la quantité en DPAP (30% molaire), la quantité

²²⁸ Komba, S.; Kitaoka, M.; Kasumi, T. A New Method of Carbohydrate Synthesis in Both Solution and Solid Phases Using a Special Hydroxy Protecting Group. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 24, 5313-5329.

d' α -thiomannose peracétylé **2.41** (4,2 éq) et le temps d'irradiation (30h). Ces modifications n'ont pas permis d'améliorer le rendement.

Enfin, l'élimination du groupement Fmoc est réalisée en présence de diéthylamine dans CH_3CN anhydre, à température ambiante pendant 3h. Après purification, le trimère **2.51** est obtenu avec un rendement de 73% (Schéma 2.31).

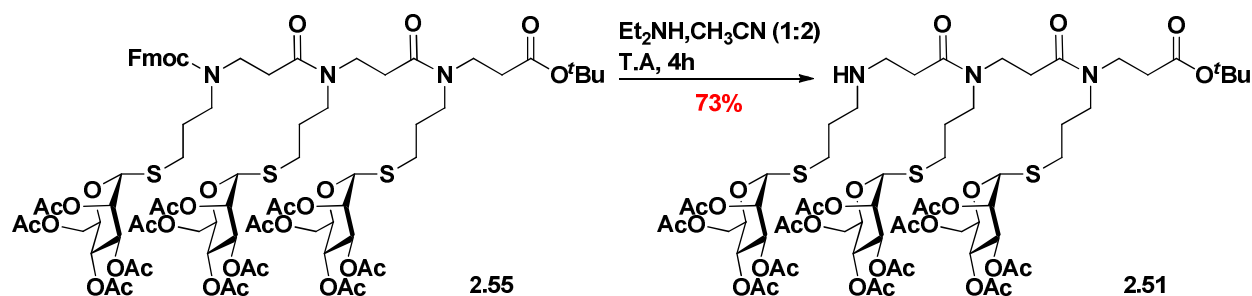


Schéma 2.31: Élimination du Fmoc du composé S-glycoconjugué **2.51**.

L'ultime étape consistait à établir un dernier couplage thiol-ène en utilisant la plateforme β -tripeptide protégée par un Fmoc **2.54** et l' α -thioGalNAc peracétylé **2.42** (Schéma 2.32).

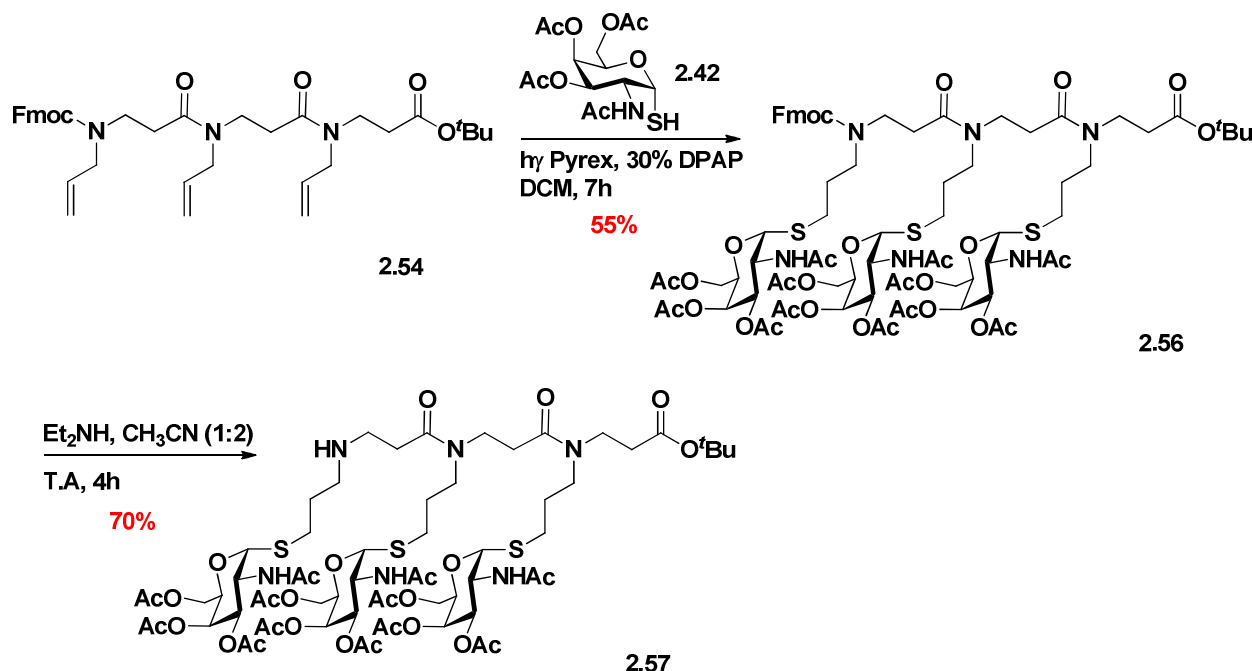


Schéma 2.32: Synthèse du β -tripeptide S-GalNAc **2.57**.

Nous avons ainsi appliqué les conditions les plus efficaces mises au point avec le mannose (Tableau 2.6 - Essai 2) mais avec directement 30% de DPAP. Après purification, le β -tripeptide

S-GalNAc **2.56** attendu est formé avec un rendement de 55%. Comme ci-dessus, l'amine de la plateforme peptoïde est ensuite libérée de son groupement Fmoc et le trimère **2.57** est obtenu avec un rendement de 70%.

D. Déprotection des unités saccharidiques

A ce stade, il nous été possible de déprotéger les sucres greffés sur les plateformes β -tripeptoides **2.51** et **2.57**. Les raisons, pour lesquelles nous avons décidé de réaliser cette opération sont identiques à celles évoquées précédemment pour les composés *O*-glycoconjugués.

Comme pour les plateformes *O*-glycosylées, cette réaction est effectuée selon les conditions de désacétylation de Zemplén (Schéma 2.33):

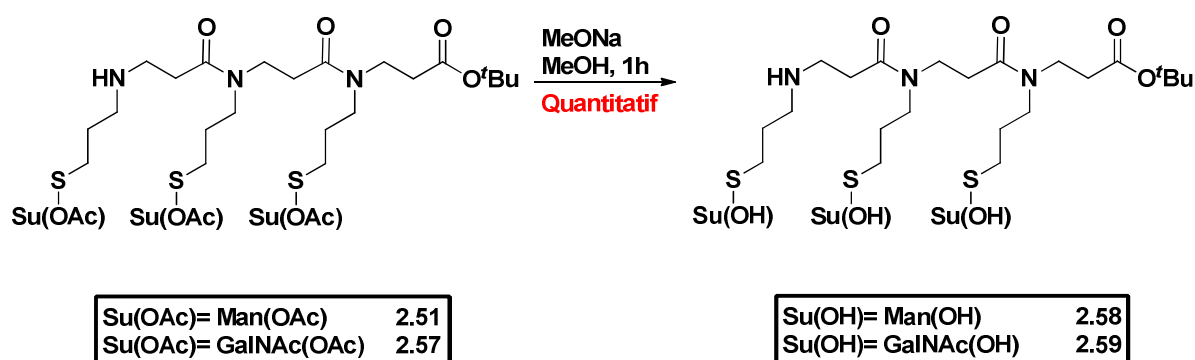


Schéma 2.33: Désacétylation des sucres des plateformes **2.51** et **2.57**.

Les plateformes β -tripeptoides *S*-glycosylées dérivées du mannose **2.51** et du GalNAc **2.57** réagissent, ainsi, avec du MeONa, en quantité catalytique, dans du MeOH anhydre et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1h, à température ambiante. Nous obtenons alors quantitativement les glycoconjugués **2.58** et **2.59**.

E. Conclusion de l'étude

L'objectif de cette étude était d'appliquer la technique de ligation par couplage thiol-ène à la synthèse des plateformes β -tripeptoides *S*-glycosylées. Pour ce faire, nous avons commencé par préparer les α -thiomonomères peracétylés **2.41** et **2.42** ainsi que la plateforme β -tripeptoïde *N*-allyle **2.43**, en s'inspirant de la littérature. Une optimisation des conditions de TEC a ensuite été

entreprise. Nous avons alors constaté qu'une protection de la plateforme peptotide par un groupement Fmoc était nécessaire pour favoriser la réaction TEC. Dans ce cadre, les composés S-glycosylés **2.55** et **2.56** ont été synthétisés avec des temps d'irradiation et des quantités en DPAP plus importantes que ceux décrits dans la littérature. De plus, malgré des rendements relativement acceptables, l'obtention, à chaque couplage, d'une quantité non négligeable en composés portant seulement un ou deux sucres ou en composés non identifiés, nous laisse penser que soit le groupement Fmoc engendre une gêne stérique pouvant altérer l'efficacité du greffage, soit que ce groupe n'est pas complètement inerte aux conditions photochimiques. Ces hypothèses ont pu être étayées grâce à l'essai de TEC réalisé avec la plateforme peptotide acétylée **2.52**, à l'origine d'un rendement plus important avec un temps d'irradiation plus court et une quantité en DPAP plus faible. Malgré cela, après l'élimination du groupement protecteur Fmoc et la déprotection efficace des sucres, nous sommes parvenus à obtenir les structures S-glycoconjuguées mannose **2.58** et GalNAc **2.59** souhaitées.

Chapitre III: Couplage des plateformes avec l'agoniste du récepteur TLR7

Le ligand naturel du récepteur TLR7 est un ARN simple brin riche en guanine et en uridine. Ce récepteur est principalement localisé dans le compartiment endosomal de certaines cellules du système immunitaire telles que les cellules dendritiques. Son activation permet la maturation et la prolifération de ces cellules qui produisent ainsi des cytokines pro-inflammatoires (comme par exemple: IL-6, IL-12 et TNF- α).⁹² Une variété d'agonistes synthétiques et de bas poids moléculaires du récepteur TLR7 ont été développés ces dernières années, allant des imidazoquinolines (dont l'Imiquimod et le Resiquimod) aux dérivés des bases puriques.^{229,230,231} La découverte de ces composés a généré un vif intérêt dans l'élaboration de nouvelles approches en immunothérapie pour le traitement des maladies infectieuses et du cancer. Parmi eux, nous pouvons citer le 9-benzyl-8-hydroxy-2-(2-méthoxyéthoxy) adénine ou SM360320 (Figure 3.1) qui est considéré comme étant un agoniste très efficace et spécifique du récepteur TLR7.²³²

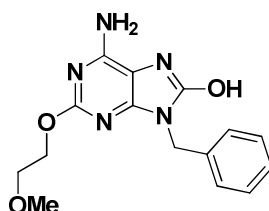


Figure 3.1: Structure du composé SM360320.

Certains groupes ont, par la suite, étudié l'intérêt de conjuguer des ligands du récepteur TLR7, dérivés de l'adénine, à des structures macromoléculaires afin d'obtenir une stimulation plus importante du système immunitaire. Hayashi et coll.²³³ ont synthétisé un dérivé du composé SM360320 appelé UC-1V150, qui présente une fonction aldéhyde libre sur le motif benzyle permettant son couplage à la sérum albumine de souris (MSA pour *Mouse Serum Albumin*) par l'intermédiaire d'un linker bifonctionnel, le succinimidyl 6-hydrazino-nicotinamide acétone hydrazone (SANH). Les résultats ont montré que cette conjugaison augmentait son activité agoniste *in vitro* et *in vivo* c'est-à-dire son potentiel d'induction de cytokine. En outre, la

²²⁹ Czarniecki, M. Small Molecule Modulators of Toll-like Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51, 6621-6626.

²³⁰ Kurimoto, A.; Hashimoto, K.; Nakamura, T.; Norimura, K.; Ogita, H.; Takaku, H.; Bonnert, R.; McNally, T.; Wada, H.; Isobe, Y. Synthesis and Biological Evaluation of 8-Oxoadenine Derivatives as Toll-like Receptor 7 Agonists Introducing the Antedrug Concept. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53, 2964-2972.

²³¹ Lee, J.; Chuang, T-H.; Redecke V.; She, L.; Pitha, P. M.; Carson, D. A.; Raz, E.; Cottam, H. B. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, 6646-6651.

²³² Kurimoto, A.; Ogino, T.; Ichii, S.; Isobe, Y.; Tobe, M.; Ogita, H.; Takaku, H.; Sajiki, H.; Hirota, K.; Kawakami, H. Synthesis and evaluation of 2-substituted 8-hydroxyadenines as potent interferon inducers with improved oral bioavailabilities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12, 1091-1099.

²³³ Wu, C. C. N.; Hayashi, T.; Takabayashi, K.; Sabet, M.; Smee, D. F.; Guiney, D. D.; Cottam, H. B.; Carson, D. A. Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, 3990-3995.

équipe a couplé le composé SM360320 à des chaînes de polyéthylène glycol (PEG, Schéma 3.4) de hauts poids moléculaires (47 à 271 unités).²³⁵

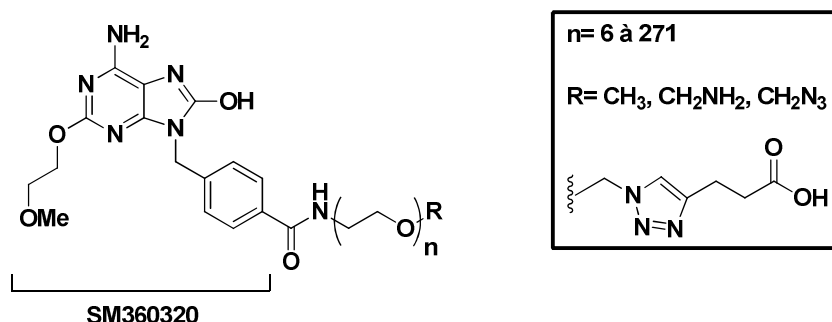


Figure 3.4: Conjugaison du SM360320 à différentes chaînes de PEG.

Par conséquent, l'ensemble de ces exemples ont mis en relief que la conjugaison d'un agoniste du récepteur TLR7 pouvait avoir des effets bénéfiques sur ses capacités d'induction de cytokines et donc sur ses propriétés immuno-adjuvantes. Les structures moléculaires associées permettant l'endocytose facilitent la rencontre entre le ligand et le récepteur TLR7, ce qui améliore la stimulation des cellules dendritiques.

Précédemment, nous avons construit des plateformes β -tripeptoides *O*- ou *S*- α -GalNAc, qui miment le cluster trimérique Tn, afin de pouvoir cibler les récepteurs MGLs des cellules dendritiques ainsi que les récepteurs BCRs spécifiques des cellules B. Ces interactions peuvent intervenir dans l'endocytose de nos édifices favorisant l'activation du TLR7. Nous avons choisi comme agoniste du récepteur TLR7, celui utilisé précédemment par Chan et al.²³⁴ pour la ligation avec le phospholipide DOPE. Plusieurs raisons nous ont conduit à choisir cet immuno-adjuvant:

- Accès rapide en 7 étapes.
- Présence d'une fonction acide carboxylique liée au groupement benzyle permettant de conjuguer ce ligand à différentes structures moléculaires.
- Structure pratiquement identique à celle de l'UC-1V150 qui est actif à des concentrations de l'ordre du nanomolaire.²³³

Dans ce chapitre, nous décrivons la méthode et les résultats obtenus pour l'accès aux structures agonistes TLR7-espaceur- β -glycopeptoides (Schéma 3.5). Nous avons commencé par

²³⁵ Chan, M.; Hayashi, T.; Mathewson, R. D.; Yao, S.; Gray, C.; Tawatao, R. I.; Kalenian, K.; Zhang, Y.; Hayashi, Y.; Lao, F. S.; Cottam, H. B.; Carson, D. A. Synthesis and Characterization of PEGylated Toll Like Receptor 7 Ligands. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, 22, 445-454.

synthétiser l'immuno-adjuvant choisi. Stratégiquement, nous avons envisagé de coupler ce dernier à l'acide amino-caproïque (espaceur) puis de conjuguer le composé résultant aux plateformes β -tripeptoides *O*- et *S*-glycosylées **2.27**, **2.38**, **2.51** et **2.57**, et enfin, pour les tests immunologiques, de désacétyler les sucres greffés sur les édifices ainsi formés.

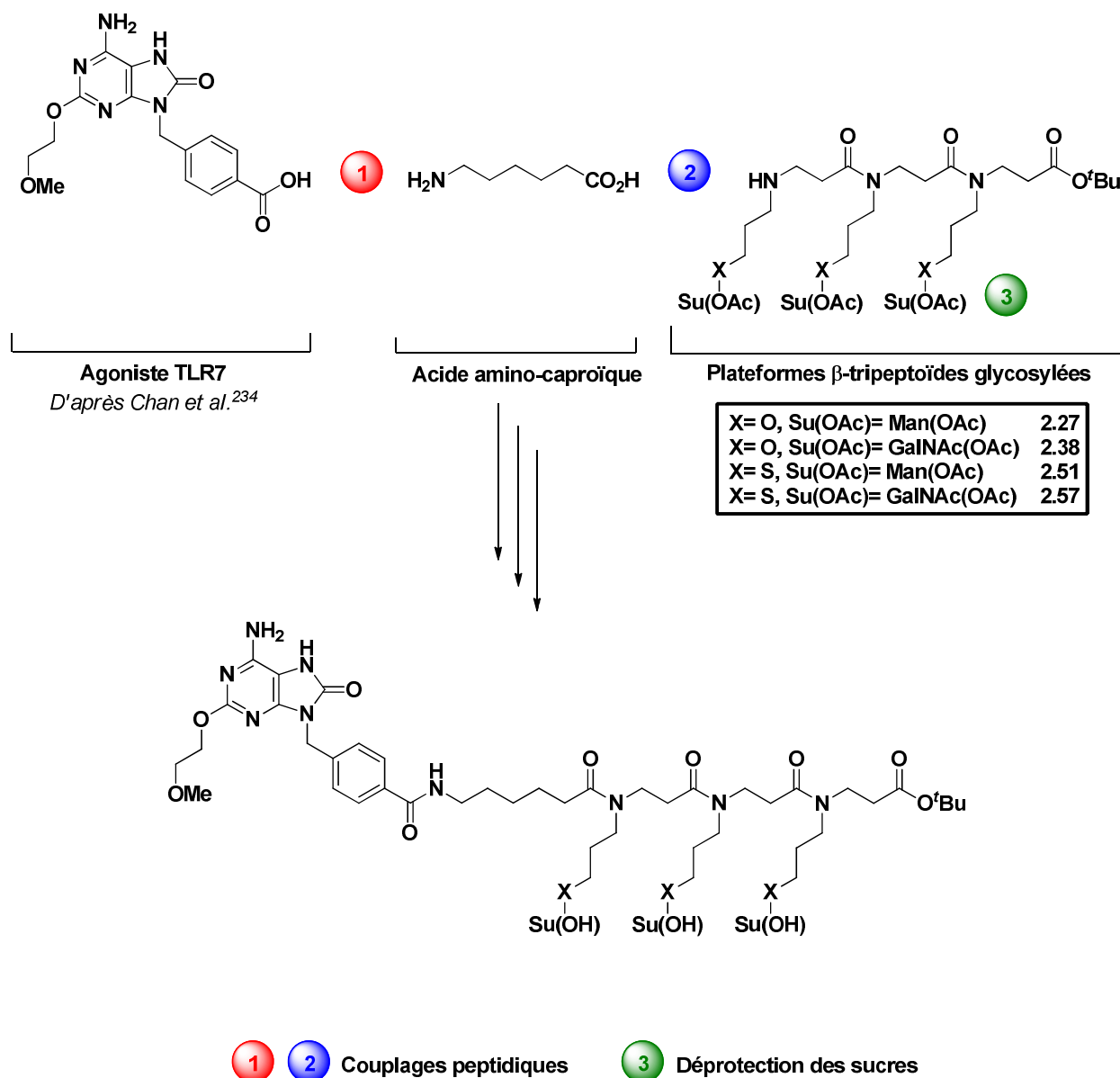


Figure 3.5: Stratégie envisagée pour l'accès aux structures agonistes TLR7-espaceur- β -glycopeptoides.

I. Conjugaison de l'agoniste du TLR7 avec l'espaceur

A. Voie de synthèse générale de l'agoniste du TLR7 (3.7)

La voie de synthèse du dérivé de l'adénine **3.7**, choisi comme ligand du TLR7, est représentée sur le schéma 3.1.^{233,234} Dans un premier temps, la chloration de la xanthine commerciale, est effectuée en présence de trichlorure de phosphoryle et de DBU, au reflux pendant 16h.²³⁶ Pour cette synthèse, POCl₃ sert à la fois de réactif et de solvant. Le DBU permet de déprotonner la xanthine, favorisant alors sa dissolution dans POCl₃ et sa chloration. Après recristallisation, la 2,6-dichloropurine **3.1** est obtenue avec un rendement de 62%.

La *N*-alkylation de la purine **3.1**, en position 9, est ensuite réalisée en présence d' α -bromo-*p*-tolunitrile et de carbonate de potassium dans le DMF à température ambiante pendant 22h. Le 4-(2,6-dichloropurine-9-ylméthyl) benzonitrile **3.2** est obtenu avec un rendement de 57%.²³³ Contrairement à la littérature, qui emploie une purification par chromatographie sur gel de silice, ce composé est obtenu pur, après précipitation dans du MeOH. L'étape suivante consiste à introduire une fonction amine primaire par substitution nucléophile aromatique du chlore en position 6 sur le composé **3.2**, en utilisant une solution d'ammonium méthanolique à 7 M. Le milieu réactionnel est placé à 60°C pendant 18h dans un autoclave. Après filtration, le 4-(amino-2-chloropurine-9-ylméthyl) benzonitrile **3.3** est formé avec un rendement de 79%.²³³ Ce dernier est ensuite mis en réaction avec le 2-méthoxyéthanolate de sodium dans du 2-méthoxyéthanol à 120°C, pendant 17h.

²³⁶ Zheng, Q.; Huang, B.; Danielsen, K.; Shukla, R.; Nagy, T. Facile and Practical Synthesis of 2,6-Dichloropurine. *Organic Process Research & Development* **2004**, 8, 962-963.

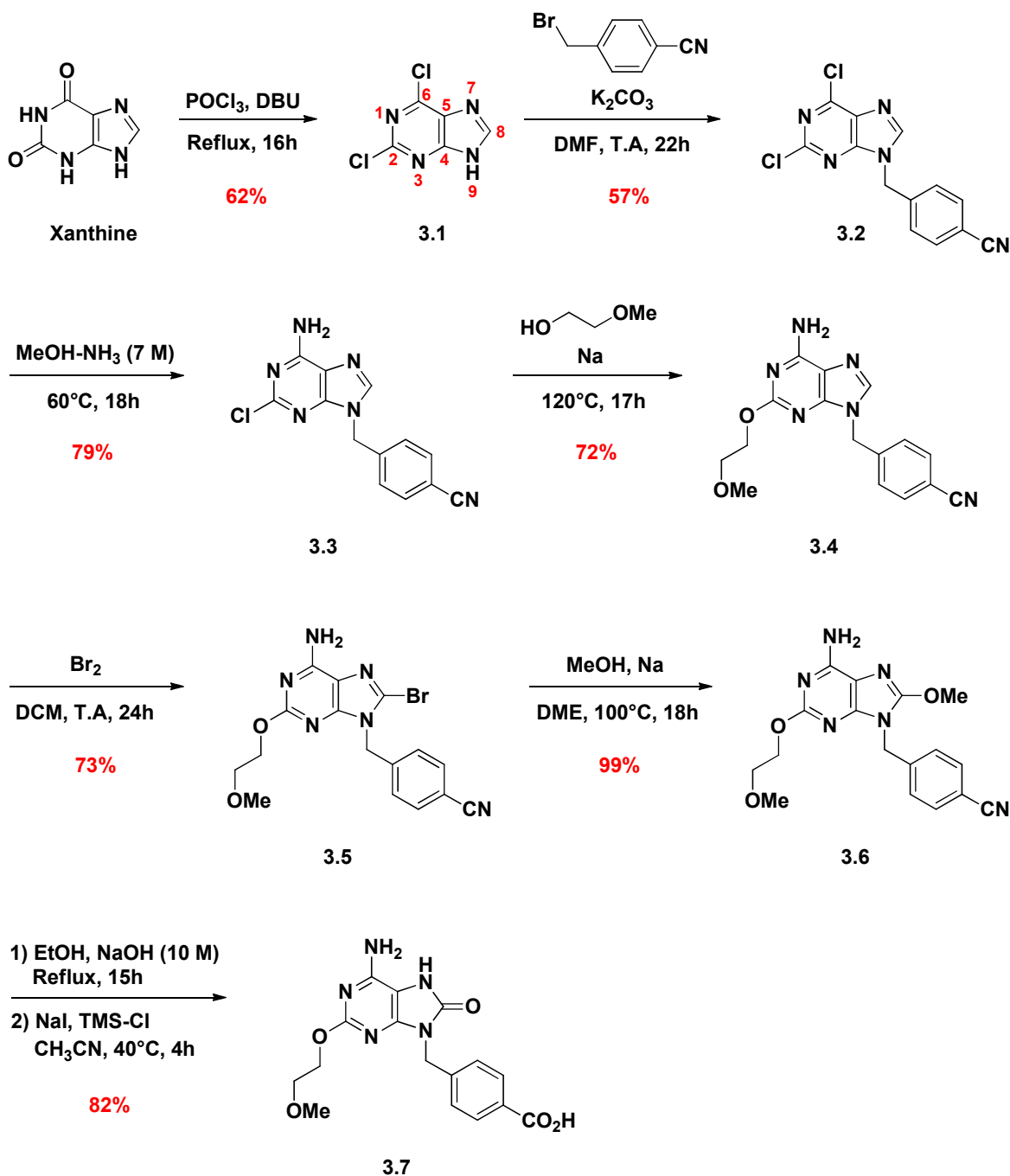


Schéma 3.1: Voie de synthèse de l'agoniste TLR7 (3.7).

La substitution nucléophile aromatique du chlore en position 2 sur le composé **3.3** permet alors l'obtention du 4-[6-amino-2-(2-méthoxyéthoxy)purine-9-ylmethyl] benzonitrile **3.4** avec un rendement de 72%. La bromation de cet hétérocycle aromatique est effectuée en présence de dibrome dans du DCM, à température ambiante pendant 24h aboutissant au composé **3.5** avec un rendement de 73%. Par la suite, la substitution du brome par un groupement méthoxy est réalisée en utilisant le méthanolate de sodium dans du DME, à 100°C pendant 18h. Le composé **3.6** est obtenu avec un rendement de 99% après purification par chromatographie sur gel de silice. Au

final, l'agoniste du récepteur Toll 7 (**3.7**) est formé suivant deux étapes successives à partir de la purine **3.6**.²³⁴ Celle-ci est placée, dans un premier temps, dans un mélange EtOH/NaOH 10 M (1:1) au reflux pendant 15h. Le milieu réactionnel est acidifié avec une solution d'acide chlorydrique concentrée puis la phase aqueuse est extraite avec du DCM. Conformément à ce qui est décrit dans la littérature, différents produits sont alors formés: le composé **3.7** attendu ainsi que l'acide 9-benzoïque-8-méthoxy **3.8** et le 9-benzoate d'éthyle-8-oxo **3.9** (Figure 3.6).

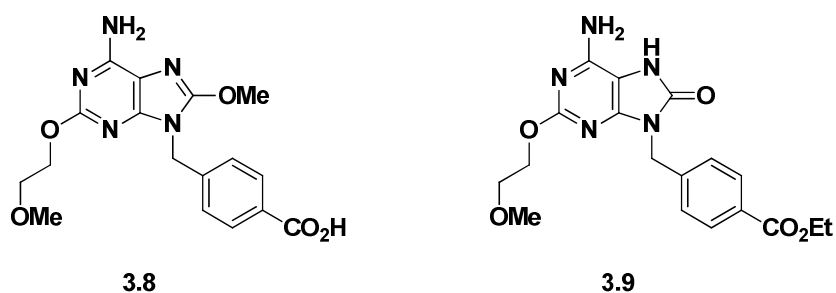


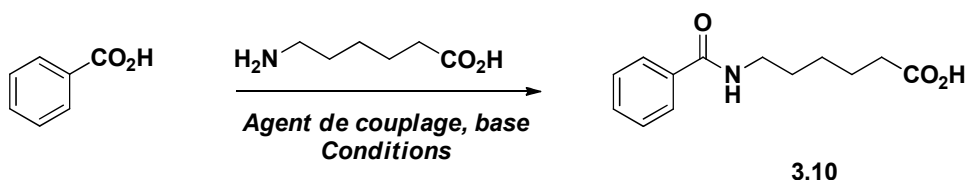
Figure 3.6: Produits formés avec l'agoniste TLR7 (**3.7**).

Ce milieu brut est ensuite traité par de l'iodure de sodium et du chlorotriméthylsilane dans CH₃CN anhydre, à 40°C pendant 4h. Après filtration, l'immuno-adjuvant **3.7** est synthétisé avec un rendement de 82%.

Pour finir, on peut ajouter que les rendements obtenus pour la synthèse des purines **3.1**, **3.3**, **3.4**, **3.5** et **3.6** sont plus importants que ceux relatés dans la littérature. L'agoniste du TLR7 (**3.7**) a donc été formé en 7 étapes avec un rendement global de 12% (rendement global obtenu dans la littérature égale à 1,2%).

B. Essais de couplage avec l'espaceur

Comme nous l'avons précisé précédemment, l'espaceur, choisi, est l'acide amino-caproïque commercial. A ce stade, notre objectif était de définir les conditions optimales de couplage peptidique entre celui-ci et l'immuno-adjuvant **3.7**. Pour ce faire, nous avons décidé d'effectuer différents essais à l'aide de l'acide benzoïque, pris comme modèle. Ainsi, ce composé nous a permis de mimer au mieux ce couplage peptidique entre la fonction acide benzoïque de l'immuno-adjuvant **3.7** et la fonction amine de l'espaceur (Tableau 3.1).



Essais	Agents de couplage	Bases	Conditions	Rendements ^a
1	HATU	Et ₃ N	DMF, T.A, 20h	-
2	IBCF	N(Bu) ₃	DMF/H ₂ O (3:1), 0°C, 2h30	75%

^a Obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice

Tableau 3.1: Essais de couplage avec l'acide benzoïque.

Pour le premier essai, nous avons utilisé les conditions mises en place par Chan et al.²³⁴ permettant la conjugaison de ce composé **3.7** avec la structure phospholipidique DOPE. De ce fait, la réaction entre l'acide amino-caproïque et l'acide benzoïque se déroule en présence d'HATU et de triéthylamine dans le DMF, à température ambiante pendant 20h (Tableau 3.1 - Essai 1). En outre, comme dans le cas de la synthèse des plateformes *O*-glycosylées par la méthode monomère (voir chapitre II), nous avons, préactivé l'acide benzoïque avec HATU avant d'ajouter l'acide aminocaproïque. La purification du milieu réactionnel par chromatographie sur gel de silice, nous a permis d'isoler dans les mêmes proportions, deux produits. Néanmoins, les analyses par RMN ¹H (CDCl₃) de ces deux produits, n'ont pas révélé la présence du composé conjugué **3.10** souhaité.

Le deuxième essai de couplage peptidique est réalisé en présence d'IBCF et de tributylamine, dans une solution DMF/H₂O (3:1) à 0°C pendant 2h30 (Tableau 3.1 - Essai 2). Le composé conjugué **3.10** est obtenu avec un rendement de 75%. Grâce à ce résultat, nous étions donc en mesure de pouvoir adapter ces conditions réactionnelles au couplage peptidique entre l'agoniste du TLR7 (**3.7**) et l'acide amino-caproïque (Schéma 3.2).

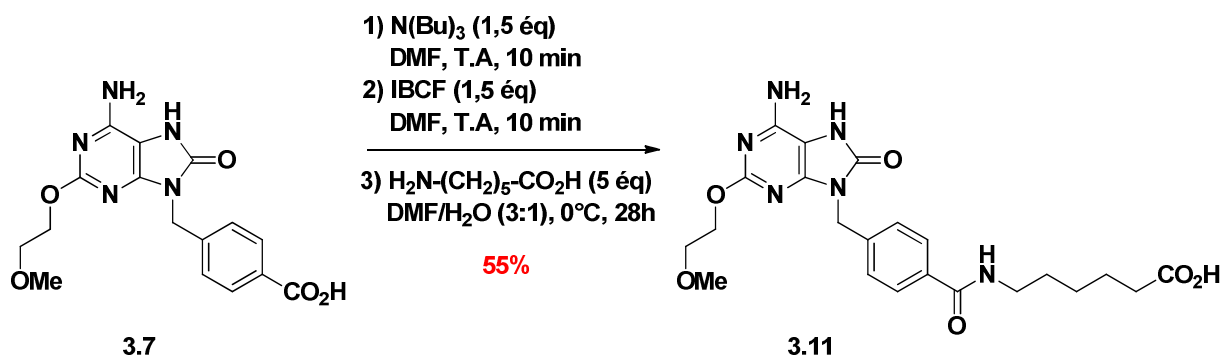


Schéma 3.2: Synthèse de l'agoniste TLR7 conjugué 3.11.

Nous avons, en outre, utilisé des quantités plus importantes en chloroformiate d'isobutyle (1,5 éq), en tributylamine (1,5 éq) ainsi qu'en acide amino-caproïque (5 éq). Cependant, le suivi par CCM de l'évolution de la réaction s'est avéré plus complexe que prévu. En effet, les rapports frontaux de l'agoniste **3.7** (réactif limitant) et de son dérivé conjugué **3.11** étaient identiques ($R_f = 0,46$; DCM/MeOH 85:15). Face à cette difficulté et pour s'assurer que la réaction arrive à son terme, nous l'avons laissé évoluer plus longtemps (28h) que dans le cas du couplage effectué avec l'acide benzoïque. Nous avons, malgré tout, réussi à isoler l'immuno-adjuvant conjugué **3.11** sous forme d'un solide blanc avec un rendement modeste de 55%. Un autre essai a été expérimenté avec une augmentation légère des quantités en agent de couplage et en base (2 éq chacun). Malheureusement cet essai ne nous a pas permis d'améliorer le rendement.

II. Conjugaison des plateformes β -tripeptoides glycosylées

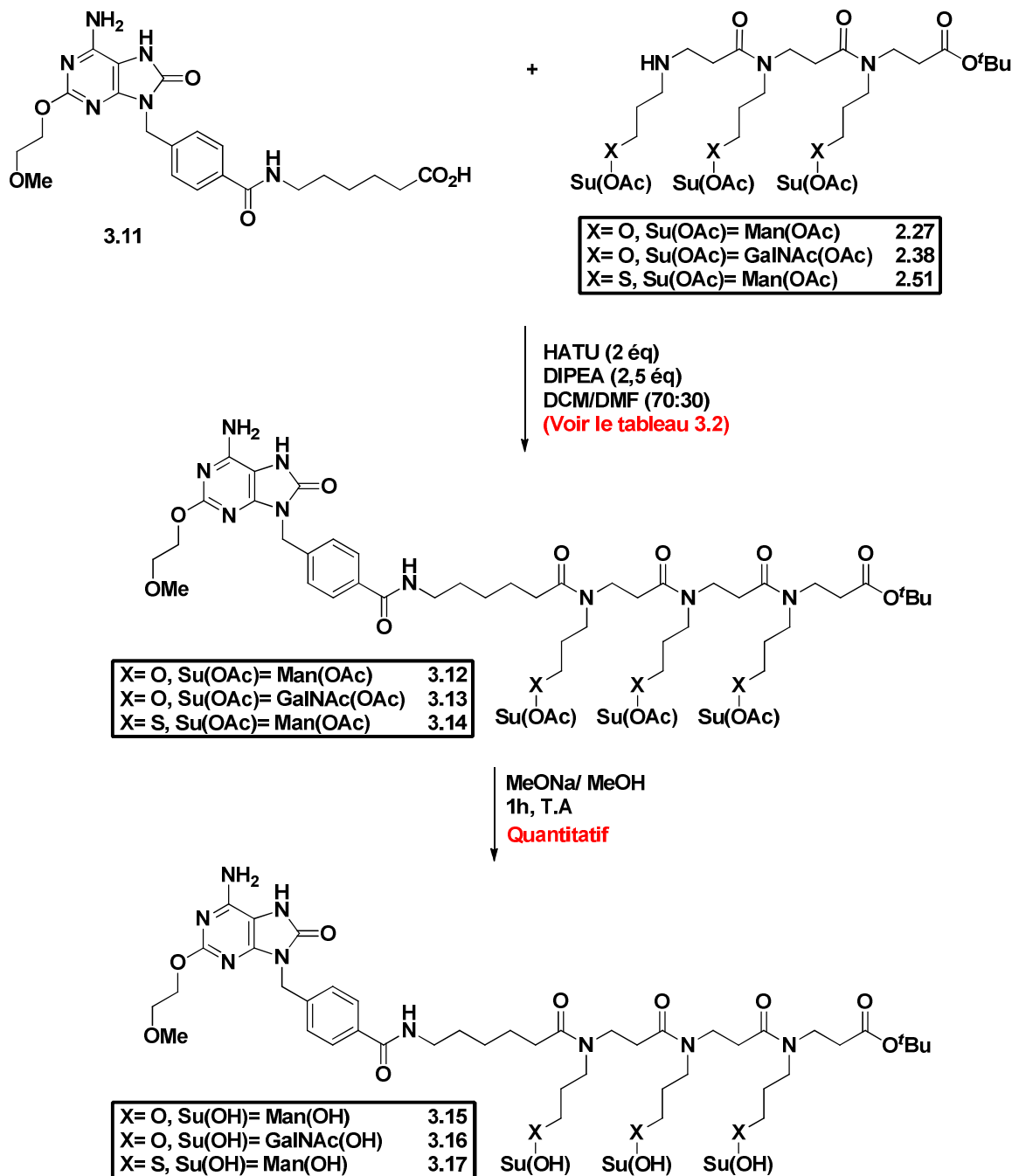
Pour réaliser les couplages peptidiques entre l'immuno-adjuvant conjugué **3.11** et les glycopeptoides, nous avons décidé d'utiliser les conditions optimales mises en place précédemment pour la synthèse des plateformes *O*-glycosylées par la méthode monomère en solution:

- Agent de couplage: HATU (2 éq).
- Base: DIPEA (2,5 éq).
- Solvants: DCM/DMF (70:30).

Le composé **3.11** et les glycopeptoides étant issus de voies de synthèse multi-étapes et dans un souci de limiter leurs pertes, leurs quantités respectives ont été fixées à 1 équivalent. Afin d'éviter des réactions secondaires et pour faciliter les purifications, nous avons utilisé les glycopeptoides présentant des sucres protégés. Un premier couplage a été effectué avec la plateforme β -tripeptide *O*-mannosylée **2.27** (Tableau 3.2 - Entrée 1). Le suivi par CCM de ce couplage a mis en évidence un avancement de réaction plus lent que pour la synthèse des plateformes *O*-glycosylées. Le temps de réaction était, de surcroît, plus important (40h). Après purification par chromatographie sur gel de silice, le composé **3.12** est obtenu avec un rendement de 53%.

De la même manière, nous avons réussi à réaliser ce couplage avec les plateformes β -tripeptoides *O*-GalNAc **2.38** et *S*-mannose **2.51** (Tableau 3.2 - Entrées 2 et 3). Les résultats sont

comparables à ceux obtenus pour le premier couplage. Faute de temps, nous ne sommes pas parvenus à effectuer cette réaction avec la plateforme *S*-GalNAc **2.57**.



Entrées	Glycopeptoides	Temps de réaction	Rendements ^a
1	2.27	40h	53%
2	2.38	48h	53%
3	2.51	42h	55%

^a Obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice.

Tableau 3.2: Synthèse des édifices agonistes TLR7-espaceur-glycopeptoides.

Nous avons ensuite déprotégé les sucres des édifices multivalents **3.12** et **3.13** grâce aux conditions de désacétylations de Zemplén. Les composés **3.15** et **3.16** ont été obtenus de façon quantitative. Ces constructions ont été employées pour les tests biologiques *in vitro* et *in vivo* afin de valider l'importance de conjuguer ensemble les trois composantes du candidat vaccin. En parallèle, nous avons également réalisé ces désacétylations sur l'édifice *S*-mannose **3.14**, avec la même réussite.

III. Conclusion de l'étude

Lors de cette étude, nous avons réussi à synthétiser, dans un premier temps, un dérivé de l'adénine **3.7**, utilisé comme agoniste du récepteur TLR7. Nous sommes parvenus à améliorer les rendements de la plupart des étapes de la voie de synthèse de ce composé par rapport à ceux décrits dans la littérature. Par la suite, nous avons réussi à développer une méthode de ligation entre cet agoniste **3.7** et l'acide amino-caproïque. Pour cela, deux essais de couplage, dans des conditions différentes, ont été effectués à partir de l'acide benzoïque, pris comme modèle. La construction agoniste TLR7-espaceur **3.11** ainsi obtenue, a pu être conjuguée efficacement aux plateformes β -tripeptoïdes *O*- et *S*-glycosylées **2.27**, **2.38** et **2.51** grâce à l'emploi de conditions optimales de couplage peptidique établies dans le chapitre précédent.

Chapitre IV: Conjugaison du peptide OVA

323-339

De nombreuses méthodes de ligation chimiosélectives de segments peptidiques, non protégés au niveau de leurs chaînes latérales, existent dans la littérature.²³⁷ La stratégie appelée ligation chimique native (NCL pour *native chemical ligation*) mise au point par Kent et ses collaborateurs,²³⁸ est l'une des plus efficaces et des plus utilisées à ce jour (Schéma 4.1). Elle permet la formation d'un lien amide en faisant réagir un peptide thioester et un cystéinyle peptide.

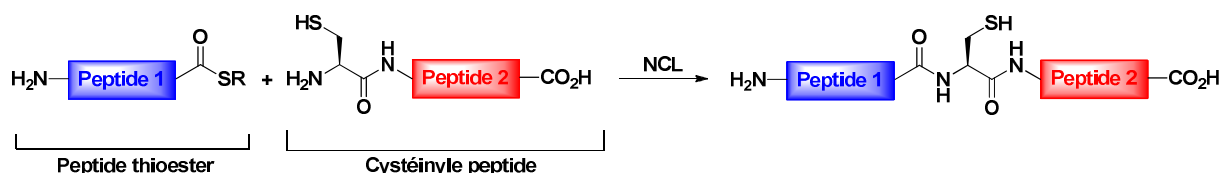


Schéma 4.1: Représentation de la méthode NCL. D'après Kent et coll.²³⁸

En France, le groupe de Melnyk a enrichi le répertoire de ligation native peptidique, en développant une technique basée sur la réactivité du groupement SEA (bis(2-sulfanyléthyl)amino) porté en C-terminal; le second partenaire étant également un cystéinyle peptide.²³⁹ Cependant, la présence d'un résidu cystéine ou d'un thioester étant des facteurs limitant pour ces ligations, d'autres stratégies permettant l'établissement d'un lien amide ont vu le jour, telles que la ligation de Staudinger²⁴⁰ ou la condensation entre des hydroxylamines et des α -cétoacides terminaux.²⁴¹

En parallèle, plusieurs équipes ont mis en place des méthodes de ligations non natives. On peut citer par exemple la formation de liens de type thioether,²⁴² thioester,²⁴³ hydrazone,²⁴⁴

²³⁷ Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D. Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, 10030-10074.

²³⁸ Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, 266, 776-779.

²³⁹ Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Bis(2-sulfanyléthyl)amino Native Peptide Ligation. *Organic Letters* **2010**, 12, 5238-5241.

²⁴⁰ Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Organic Letters* **2000**, 2, 1939-1941.

²⁴¹ Pattabiraman, V. R.; Ogunkoya, A. O.; Bode, J. W. Chemical Protein Synthesis by Chemoselective α -Ketoacid-Hydroxylamine (KAHA) Ligations with 5-Oxaproline. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, 5114-5118.

²⁴² Englebrechtsen, D. R.; Garnham, B.; Alewood, P. F. A Cassette Ligation Strategy with Thioether Replacement of Three Gly-Gly Peptide Bonds: Total Chemical Synthesis of the 101 Residue Protein Early Pregnancy Factor [ψ (CH₂S)]^{28-29,56-57,76-77}. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 5883-5890.

²⁴³ Baca, M.; Kent, S. B. H. Catalytic contribution of flap-substrate hydrogen bonds in "HIV-1 protease" explored by chemical synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90, 11638-11642.

²⁴⁴ Gaertner, H. F.; Offord, R. E.; Cotton, R.; Timms, D.; Camble, R.; Rose, K. Chemo-enzymatic Backbone Engineering of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 7224-7230.

triazole (par CuAAC)²⁴⁵ ou oxime. Ce dernier cas a, par ailleurs, été expérimenté par l'équipe de Delmas dont nous avons déjà évoqué un exemple précédemment (Figure 1.13).⁵⁵ Celui-ci fait référence à la synthèse d'un candidat vaccin peptidique où deux unités MUC1 et un épitope T_H (PADRE) sont liés ensemble par l'intermédiaire de liaisons oximes. Une autre étude plus récente concerne la ligation entre un peptide thioacide et un autre peptide avec à l'extrémité *N*-terminale un groupement aziridine, entraînant l'établissement d'une forme réduite du lien amide.²⁴⁶

Dans ce chapitre, sont présentées deux stratégies envisagées pour la conjugaison du peptide OVA 323-339 aux structures agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptoides *O*-glycosylées (Schéma 4.2).

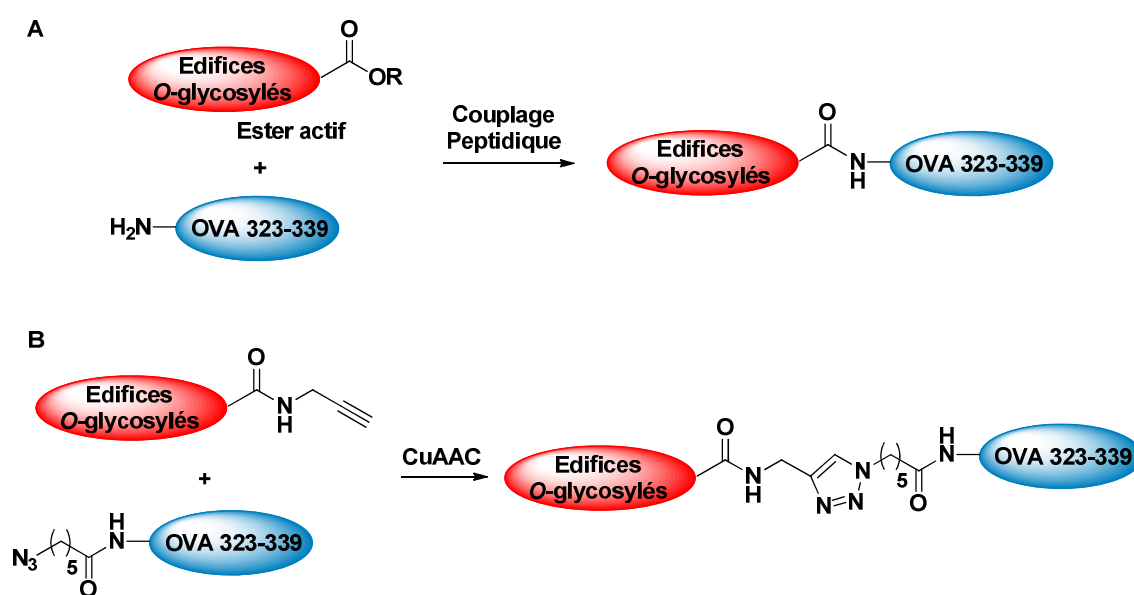


Schéma 4.2: Assemblage du peptide OVA 323-339 aux édifices *O*-glycosylés:
A) Couplage peptidique direct; B) Ligation CuAAC.

La première a consisté à effectuer un couplage peptidique direct entre l'extrémité *N*-terminale du peptide et l'extrémité *C*-terminale de nos structures, utilisées sous forme d'esters actifs (Schéma 4.2A). Deux essais de couplages peptidiques ont été réalisés avec des édifices présentant des sucres protégés ou déprotégés. Pour la seconde stratégie, nous avons employé la réaction de CuAAC (Schéma 4.2B). Pour ce faire, il était nécessaire de synthétiser des composés fonctionnalisés en position *C*-terminale par un alcyne (couplage avec la propargylamine) ainsi que d'introduire un groupement azoture en position *N*-terminale du peptide OVA 323-339 (couplage avec l'acide 6-azidohexanoïque). Dans le cadre de ce type de ligation, les sucres

²⁴⁵ Valverde, I. E.; Lecaille, F.; Lalmanach, G.; Aucagne, V.; Delmas, A. F. Synthesis of a Biologically Active Triazole-Containing Analogue of Cystatin A Through Successive Peptidomimetic Alkyne-Azide Ligations. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 718-722.

²⁴⁶ Assem, N.; Natarajan, A.; Yudin, A. K. Chemoselective Peptidomimetic Ligation Using Thioacid Peptides and Aziridine Templates. *Journal of American Chemical Society* **2010**, *132*, 10986-10987.

greffés aux plateformes peptoïdes ont été désacétylés. De manière générale, les peptides employés pour ces réactions ont été synthétisés à façon.

I. Conjugaison par couplage peptidique

A. Essais avec des sucres protégés

Afin de mener à bien ce couplage peptidique, nous avons décidé, au préalable, de mettre en place des conditions de réaction à partir de composés modèles. L'intérêt, ici, étant de limiter la consommation en édifices agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptoïdes *O*-glycosylés, issus de nombreuses étapes, et en peptide OVA 323-339. Pour ce faire, nous avons utilisé la plateforme β -tripeptoïde *O*-mannose **2.32** et le chlorhydrate d'ester éthylique de L-valine (Schéma 4.3). Cette forme salifiée de l'acide aminé est commerciale et nous permet avantageusement d'étudier les conditions de couplage à partir d'un ammonium, comme c'est le cas du peptide OVA 323-339 (sel de TFA). Pour effectuer ce couplage peptidique, nous avons décidé de passer par la formation d'un ester de pentafluorophényle (ester activé) car, à l'instar de celui obtenu avec la *N*-hydroxysuccinimide (NHS), il est souvent employé dans la littérature dans le cadre de couplages avec des peptides non protégés sur leurs chaînes latérales et notamment lorsque des fonctions acides carboxyliques sont présentes.

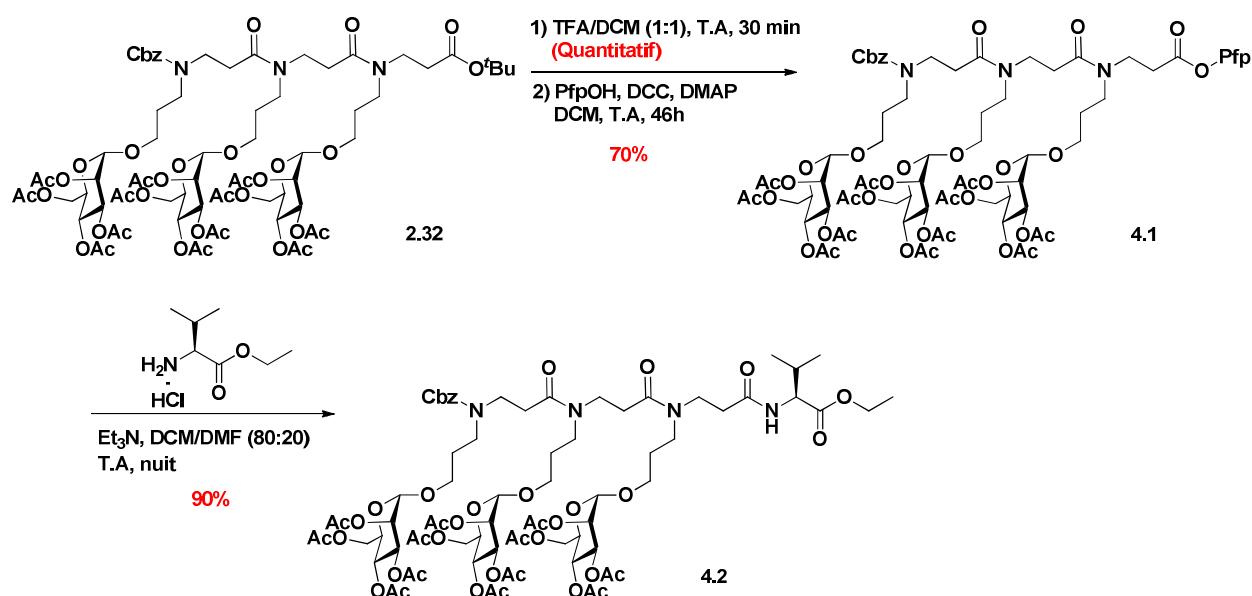
L'extrémité *C*-terminale de la plateforme **2.32** est tout d'abord déprotégée de son ester de *tert*-butyle par le mélange TFA/DCM (1:1) à température ambiante pendant 30 min. L'acide carboxylique ainsi obtenu est directement engagé dans une étape d'estérification de Steglich²⁴⁷ par traitement avec du DCC (1,9 éq), du DMAP (0,2 éq) et du pentafluorophénol (1,1 éq) dans du DCM anhydre, à température ambiante.^{248,249} La réaction est laissée sous agitation pendant 46h jusqu'à disparition complète de l'acide carboxylique, observée en CCM. Cependant, afin d'accélérer l'avancement qui s'avérait être lent, nous avons dû, au cours de la réaction (à T= 21h), rajouter 1 éq de DCC et de pentafluorophénol ainsi que 0,4 éq de DMAP. Au final, après élimination de la dicyclohexylurée (DCU) par filtration et après purification du milieu par

²⁴⁷ Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition* **1978**, *17*, 522-524.

²⁴⁸ Rivera, J. M.; Martín, T.; Rebek, J. Jr. Chiral Softballs: Synthesis and Molecular Recognition Properties. *Journal of American Chemical Society* **2001**, *123*, 5213-5220.

²⁴⁹ Hou, J-L.; Yi, H-P.; Shao, X-B.; Li, C.; Wu, Z-Q.; Jiang, X-K.; Wu, L-Z.; Tung, C-H.; Li, Z-T. Helicity Induction in Hydrogen-Bonding-Driven Zinc Porphyrin Foldamers by Chiral C₆₀-Incorporating Histidines. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 796-800.

chromatographie sur gel de silice, l'ester de pentafluorophényle **4.1** est obtenu avec un rendement de 70%. Le couplage peptidique avec le chlorure d'ester éthylique de L-valine est ensuite réalisé en présence de triéthylamine dans un mélange anhydre DCM/DMF (80:20), à température ambiante pendant une nuit.²⁵⁰ Pour ce couplage, les quantités en ester **4.1** et en acide aminé sont toutes les deux fixées à 1 équivalent. Après purification, le composé **4.2** est isolé avec un rendement de 90%.

Schéma 4.3: Synthèse du glycoconjugué **4.2**.

Ces conditions efficaces de synthèse utilisées avec nos composés modèles ont alors pu être adaptées au couplage entre le peptide OVA 323-339 et l'édifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptide *O*-mannose peracétylé **3.12** (Schéma 4.4). Comme précédemment, à partir de cet édifice **3.12**, l'acide carboxylique est quantitativement formé en présence d'un mélange TFA/DCM, à température ambiante pendant 30 min. Ensuite, une nouvelle étape d'estérification de Steglich est effectuée. Néanmoins, au vu de la lenteur de l'avancement observée avec la plateforme peptoïde **2.32**, nous avons directement introduit des quantités plus importantes en DCC (3 éq), en pentafluorophénol (2,1 éq) et en DMAP (0,6 éq). Après disparition totale de l'acide carboxylique au bout de 24h et après purification par chromatographie sur gel de silice, l'ester activé **4.3** est obtenu avec un rendement de 70%. Afin de suivre de manière adéquate l'évolution du couplage, cet ester et le peptide OVA 323-339 ont été caractérisés par HPLC analytique. Leurs temps de rétention sont respectivement de 19,4 min et de 4,2 min.

²⁵⁰ Pryor, K. E.; Rebek, J. Jr. Multifunctionalized Glycolurils. *Organic Letters* **1999**, 1, 39-42.

Comme ce fut le cas avec nos composés modèles, le couplage peptidique (Schéma 4.4) est effectuée par traitement avec de la triéthylamine dans un mélange de solvants anhydres DMF/DCM (80:20), à température ambiante. L'ester de pentafluorophényle **4.3** et le peptide sont en quantité équimolaire (1 éq chacun). La réaction est laissée sous agitation pendant une nuit. Après analyse du milieu réactionnel par HPLC, nous avons remarqué la disparition complète de l'ester **4.3** mais également la présence du peptide OVA 323-339, celle du pentafluorophénol ($T_r = 18,5$ min) et de deux nouveaux produits. Le premier ($T_r = 6,3$ min), que nous appellerons produit **A**, présentait une intensité sur le chromatogramme HPLC (en mAU) presque identique à celle du peptide alors que l'autre ($T_r = 21,9$ min - produit **B**) était minoritaire.

Nous avons malgré tout pris la décision d'arrêter la réaction et de purifier le milieu par HPLC préparative dans le but d'identifier les composés **A** et **B**. L'ensemble des composés ont donc pu être séparés et récupérés. Les produits **A** et **B** ont été, par la suite, caractérisés par RMN ^1H (D_2O) et par HR-MS. Malheureusement, aucun des deux produits ne correspondaient au composé conjugué **4.4** attendu. La structure du produit **B** n'a pu être identifiée alors que le produit **A** s'est avéré être l'acide carboxylique obtenu précédemment à partir de l'édifice **3.12**. Il semblerait que la non réactivité entre le peptide OVA 323-339 et l'ester de pentafluorophényle **4.3** favorise la détérioration dans le temps de ce dernier, aboutissant à la formation de l'acide carboxylique. On peut également penser que l'acide carboxylique s'est peut être formé pendant l'analyse HPLC. De ce fait, les conditions de couplage mises en place ne permettaient pas l'établissement du lien amide.

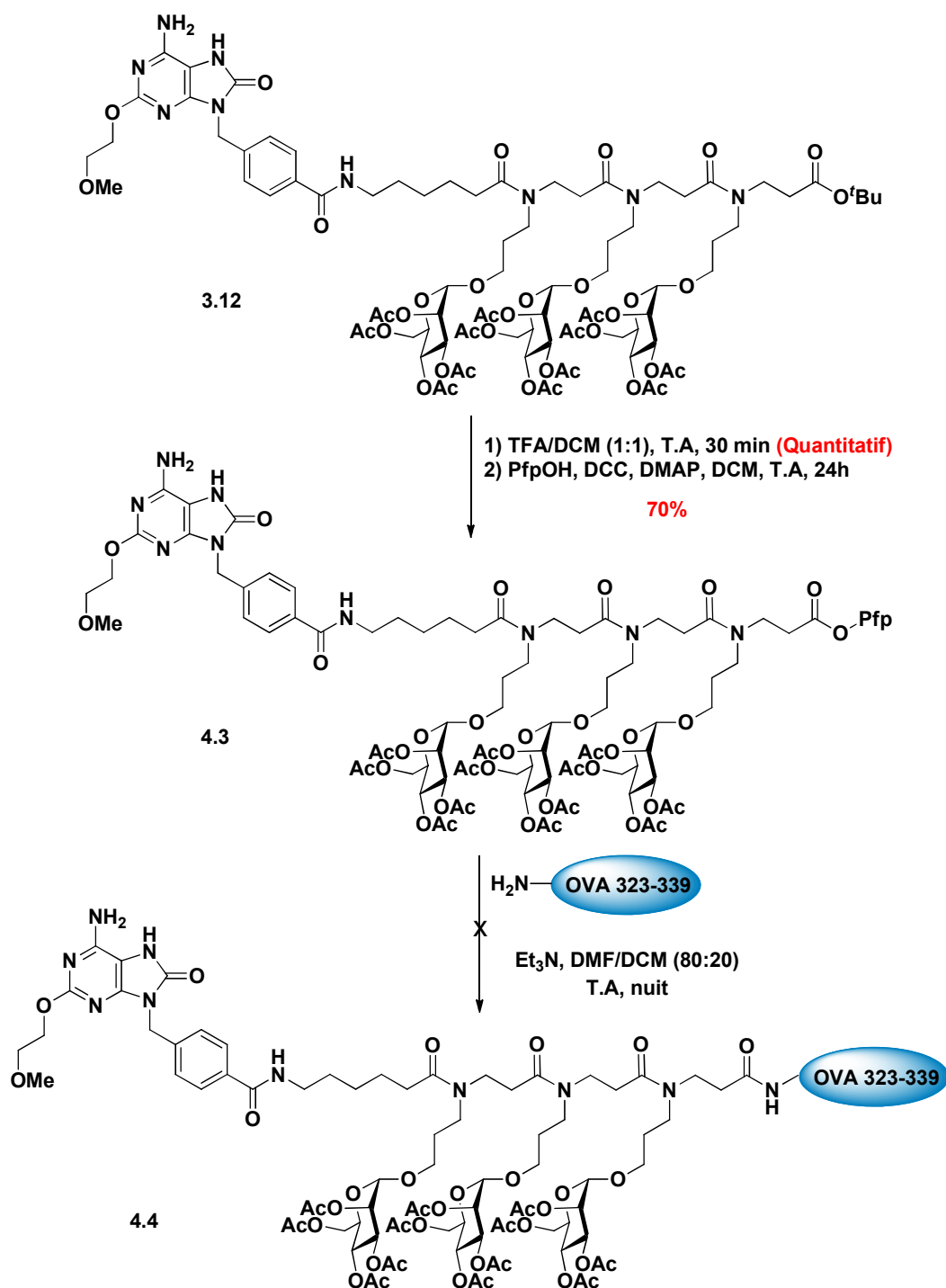


Schéma 4.4: Essai de couplage peptidique du peptide OVA 323-339 avec l'édifice 3.12.

B. Essai avec des sucres libres

Pour réaliser le couplage peptidique avec des sucres libres greffés sur nos structures, nous nous sommes inspirés des travaux effectués par Guo et ses collaborateurs sur la synthèse

chimique en solution de glycopeptides à partir de monomères glycosylés.^{251,252,253} Les fonctions alcools libres de ces sucres permettent aux glycopeptides d'être solubles dans des solvants organiques polaires et insolubles dans les autres types de solvants. La synthèse de ces glycopeptides se déroule donc dans des solvants tels que le NMP ou le DMF (solutions homogènes) et leurs précipitations interviennent par addition de diéthyléther dans le milieu. Les solides obtenus par filtration sont lavés alors que les sous-produits de même que les excès de réactifs restent, eux, en majorité dans le filtrat. De ce fait, l'utilisation de sucres libres et l'ajout de diéthyléther facilite la purification des glycopeptides formés à chaque étape de synthèse. C'est une méthode rapide, efficace qui permet, la plupart du temps, de s'affranchir des étapes de purification par chromatographie sur colonne. De plus, la présence de fonctions alcools libres a l'avantage de ne pas altérer les couplages peptidiques.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux modes opératoires définies pour le couplage entre un nonapeptide et un glycotripeptide présentant des sucres déprotégés (Schéma 4.5).²⁵⁴ Comme dans notre cas, le nonapeptide qu'ils utilisent, possède plusieurs fonctions acides carboxyliques libres qui peuvent interférer dans la réaction de couplage. L'activation de l'acide carboxylique du glycotripeptide passe donc par la formation d'un ester de pentafluorophényle.

²⁵¹ Guo, Z.; Shao, N. Glycopeptide and Glycoprotein Synthesis Involving Unprotected Carbohydrate Building Block. *Medicinal Research Reviews* **2005**, 25, 655-678.

²⁵² Xue, J. Guo, Z. Efficient Synthesis of Complex Glycopeptides Based on Unprotected Oligosaccharides. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68, 2713-2719.

²⁵³ Wen, S.; Guo, Z. Unprotected Oligosaccharides as Phase Tags: Solution-Phase Synthesis of Glycopeptides with Solid-Phase Workups. *Organic Letters* **2001**, 3, 3773-3776.

²⁵⁴ Shao, N.; Xue, J.; Guo, Z. Chemical Synthesis of CD25 Glycopeptides Containing the Acid-Labile Fucosyl Linkage. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68, 9003-9011.

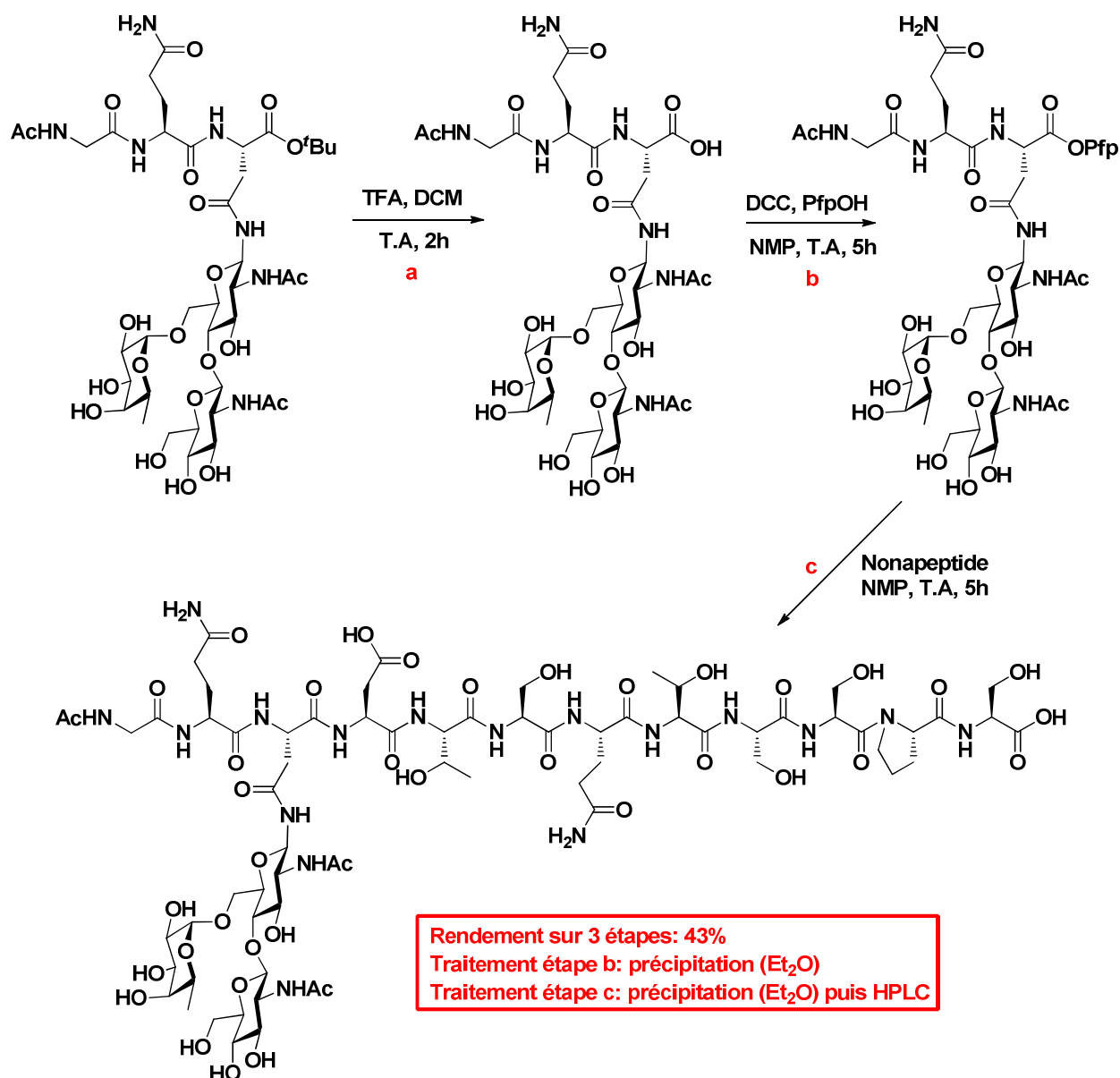


Schéma 4.5: Exemple de stratégie de synthèse entre un nonapeptide et un glycotripeptide

D'après Guo et coll.²⁵⁴

Dans un premier temps, nous avons synthétisé quantitativement l'acide carboxylique correspondant à l'édifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptidoïde *O*-mannose-(OH) **3.15** par traitement par dans un mélange TFA/DCM (1:1), à température ambiante pendant 1h40 (Schéma 4.6).

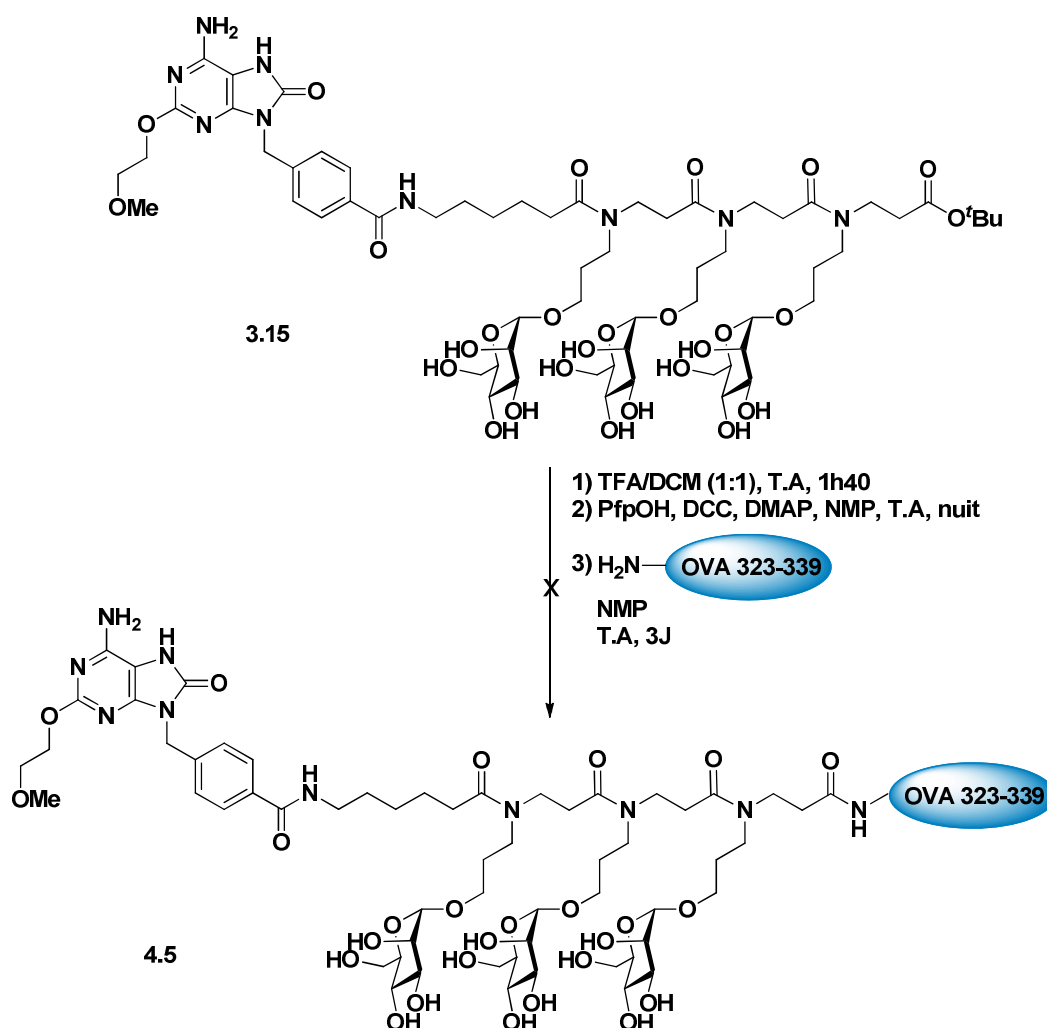


Schéma 4.6: Essai de couplage peptidique du peptide OVA 323-339 avec l'édifice 3.15.

Après lyophilisation, celui-ci est directement engagé dans l'étape d'estérification de Steglich. Contrairement aux essais précédents, nous avons cette fois-ci utilisé des quantités très importantes en DCC (20 éq) et en pentafluorophénol (10 éq). De plus, par rapport à la littérature,²⁵⁴ nous avons pris l'initiative de rajouter du DMAP (0,6 éq). Au bout d'une nuit, du diéthyléther est ajouté et nous obtenons alors un solide blanc qui est directement engagé dans l'étape de couplage peptidique avec le peptide OVA 323-339 (1 éq) dans le NMP, à température ambiante. De la même manière, après 3 jours de réaction, un nouveau solide blanc est formé par introduction de diéthyléther dans le milieu. L'analyse par HR-MS de ce dernier, a révélé la présence de quantités importantes en peptide OVA 323-339 ainsi qu'en acide carboxylique synthétisé auparavant à partir de l'édifice **3.15**. Malheureusement, aucune trace du composé conjugué **4.5** souhaité n'a été détecté. Par conséquent, comme dans le cas de l'essai avec les sucres protégés, ces conditions opératoires ne sont pas favorables au couplage avec le peptide

OVA 323-339. La mise en place d'une autre stratégie de conjugaison, notamment par CuAAC, a alors été développée.

II. Conjugaison de type 1,2,3-triazole par CuAAC

A. Rappels bibliographiques

La cycloaddition thermique de Huisgen entre un azoture organique et un alcyne vrai conduit généralement à un mélange de 1,4- et 1,5-régioisomères.²⁵⁵ De manière indépendante, les groupes de Sharpless²⁵⁶ et de Meldal²⁵⁷ ont montré que l'utilisation de Cu^(I) conduisait exclusivement au régioisomère 1,4 et diminuait le temps de réaction de 10⁷ fois, permettant ainsi de s'affranchir totalement de la nécessité d'une élévation de température (Schéma 4.7). On parle, ici, de cycloaddition [3+2] azide-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC).

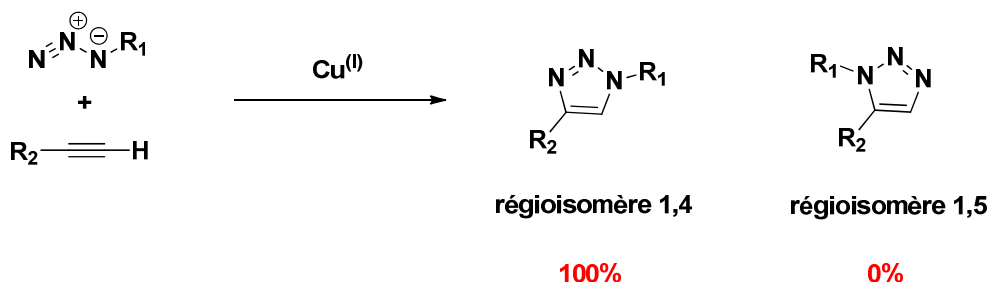


Schéma 4.7: Régiospécificité de la réaction de CuAAC.

Les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire ainsi réalisées rentrent parfaitement dans le cadre de la «Click Chemistry». C'est un concept défini pour la première fois par Sharpless.²⁵⁸ Il se base sur différents critères qu'une réaction doit remplir afin de pouvoir être qualifiée de «Click Chemistry». Les critères énoncés par Sharpless sont les suivants:

- La réaction doit être modulaire (mettant en jeu des « blocs » à assembler).

²⁵⁵ Huisgen, R. Kinetics and reaction mechanisms: selected examples from the experience of forty years. *Pure and Applied Chemistry* **1989**, 61, 613-628.

²⁵⁶ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, 2596-2599.

²⁵⁷ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M.; Peptidotriazoles on Solid Phase:[1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 3057-3064.

²⁵⁸ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, 2004-2021.

- La réaction doit présenter un large champ d'application.
- Des conditions de réaction simples (idéalement insensibles à l'oxygène et à l'eau).
- Des substrats de départ et des réactifs facilement accessibles.
- Absence de solvant ou utilisation d'un solvant non toxique (tel que l'eau).
- Un processus de purification du produit formé qui doit être simple (méthodes non chromatographiques).
- Les rendements doivent être très élevés.
- Les sous-produits générés doivent être « inoffensifs » et doivent pouvoir être éliminés par des méthodes non chromatographiques.
- La réaction doit être stéréospécifique (mais pas nécessairement énantiosélective).

L'espèce Cu^{I} peut être introduite directement sous forme de sels (CuI , CuBr , $\text{CuOTf.C}_6\text{H}_6\ldots$) mais elle peut également être introduite sous forme de sels de Cu^{II} , tels que $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, en présence d'un réducteur, comme l'acide ascorbique ou l'ascorbate de sodium.

La cycloaddition 1,3-dipolaire par CuAAC est une méthode de ligation qui a été récemment mise en exergue, par l'équipe de Delmas et Aucagne, pour le couplage de peptides non protégés.^{245,259} L'hétérocycle 1,2,3-triazole est un bioisostère^{260,261} du lien amide *trans* présent dans les peptides dont il mime très précisément les critères géométriques, stériques et électroniques. Il peut également participer à la formation de liaisons hydrogènes et d'interactions dipôle-dipôle. De plus, certaines études ont montré que ce cycle 1,2,3-triazole est un groupement peptidomimétique qui peut favoriser la structuration secondaire des peptides.²⁶²

La réaction de CuAAC est donc une méthode robuste, rapide, régiospécifique, orthogonale à d'autres réactions et surtout tolérante vis-à-vis de nombreux groupes fonctionnels et notamment ceux présents sur les chaînes latérales non protégées des peptides.

Afin de mettre en place cette stratégie de ligation, nous devons, préalablement, élaborer des édifices fonctionnalisés par un alcyne. Le peptide OVA 323-339, quant à lui, a été fonctionnalisé par un azoture.

²⁵⁹ Aucagne, V.; Valverde, I. E.; Marceau, P.; Galibert, M.; Dendane, N.; Delmas, A. F. Towards the Simplification of Protein Synthesis: Iterative Solid-Supported Ligations with Concomitant Purifications. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 11320-11324.

²⁶⁰ Hua, Y.; Flood, A. H. Click chemistry generates privileged CH hydrogen-bonding triazoles: the latest addition to anion supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1262-1271.

²⁶¹ Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, Y. C. D.; Ghadiri, M. R. Heterocyclic Peptide Backbone Modifications in an α -Helical Coiled Coil. *Journal of American Chemical Society* **2004**, *126*, 15366-15367.

²⁶² Ko, E.; Liu, J.; Perez, L. M.; Lu, G.; Schaefer, A.; Burgess, K. Universal Peptidomimetics. *Journal of American Chemical Society* **2011**, *133*, 462-477.

B. Synthèse des édifices fonctionnalisés par un alcyne

L'introduction du groupement alcyne a été effectuée à l'extrémité C-terminale par couplage peptidique avec la propargylamine sur des composés présentant des sucres peracétylés. Stratégiquement, nous avons décidé d'introduire directement ce groupement sur nos plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées protégées à l'extrémité N-terminale. Ces plateformes ont, ensuite, été déprotégées puis couplées à l'agoniste du TLR7 **3.11** lié à l'acide amino-caproïque. Au final, les sucres des édifices obtenus ont été désacétylés. Néanmoins, nous ne pouvions pas utiliser les plateformes *O*-mannose **2.32** et *O*-GalNAc **2.37** précédemment formées (**chapitre II**), car l'élimination du groupement carboxybenzyle par hydrogénolyse pourrait entraîner la réduction de l'alcyne. Pour nos synthèses, le Cbz a alors été remplacé par un groupement Fmoc, généralement éliminé dans des conditions basiques.

La synthèse des plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées, protégées en N-terminale par un Fmoc, a nécessité l'utilisation de la méthode monomère en solution. Pour ce faire, nous sommes partis des monomères amines mannose **2.12** et GalNAc **2.13**. Ils sont, tout d'abord, traités en présence de 9-fluorénylméthyle chloroformiate (Fmoc-Cl) et d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium dans le 1,4-dioxane (Schéma 4.8). Les glycosides mannose **4.6** et GalNAc **4.7** sont obtenus avec des rendements respectivement de 91% et de 84%.

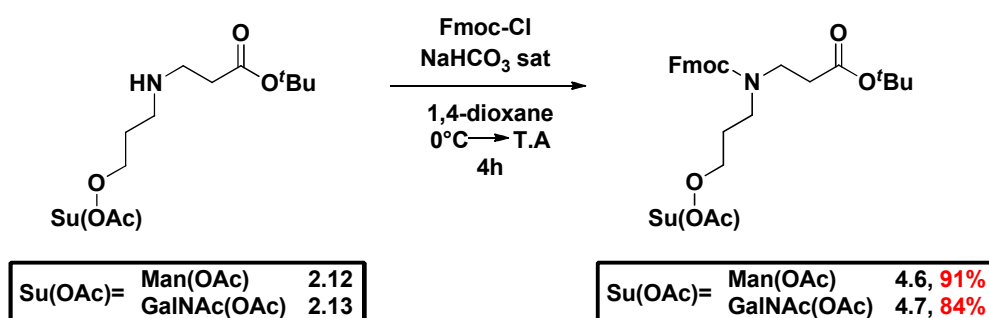


Schéma 4.8: Protection des monomères amines **2.12** et **2.13** par un groupement Fmoc.

A partir de ces glycosides, nous avons utilisé les modes opératoires mis au point pour la synthèse des plateformes β -glycopeptoides **2.32** et **2.37** protégées par le groupement carboxybenzyle (Schéma 4.9). Les partenaires acides carboxyliques mannose et GalNAc sont formés quantitativement par traitement des glycoconjugués correspondants par un mélange TFA/DCM (1:1), à température ambiante pendant 1h15. Ils sont, à chaque fois, directement engagés sans purification dans l'étape de couplage peptidique. Pour l'ensemble des couplages

peptidiques, nous avons utilisé les conditions optimales définies auparavant (Tableau 2.4, essai 8). Les quantités en composés glycosylés engagés à chaque couplage sont fixées à 1 éq. Les dimères mannose **4.8** et GalNAc **4.9** sont respectivement obtenus avec des rendements de 90% et 81%. Les trimères mannose **4.10** et GalNAc **4.11** sont, quant à eux, formés avec des rendements de 87% et de 75%.

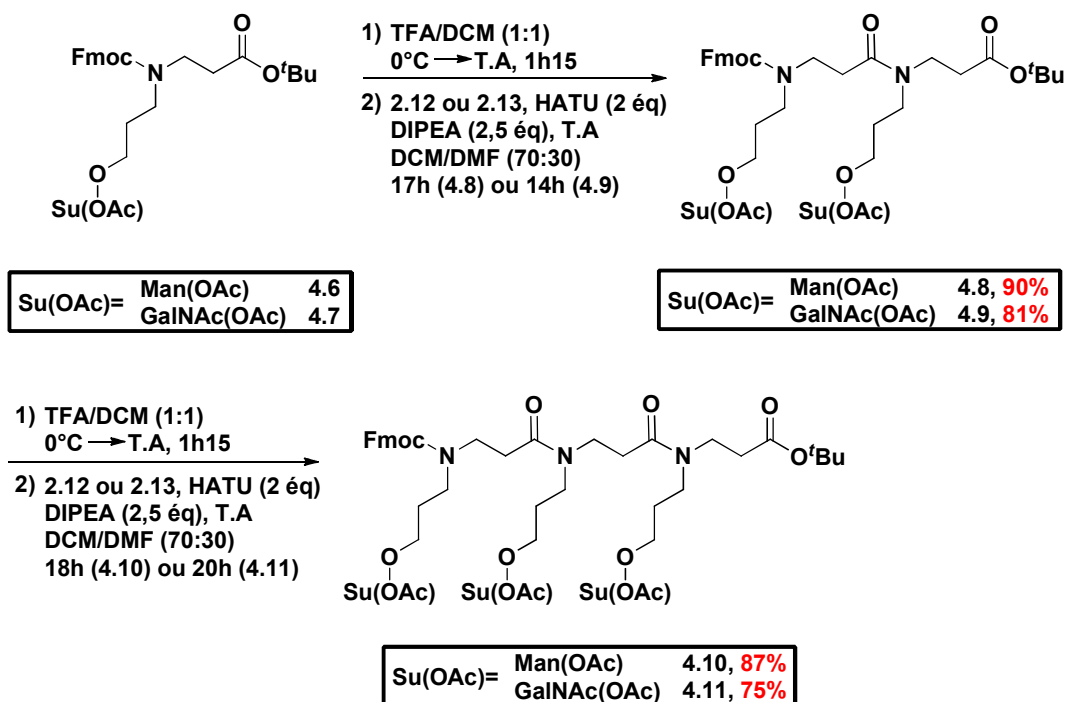


Schéma 4.9: Synthèse des plateformes β -glycopeptoides **4.10** et **4.11** par la méthode monomère en solution.

Grâce à ces résultats, il nous a été possible de les comparer avec ceux observés auparavant pour la synthèse des glycoconjugués *O*-mannose **2.32** et *O*-GalNAc **2.37**. Nous avons alors constaté alors que:

- Dans l'ensemble, les couplages peptidiques effectués avec des composés mannosylés donnent de meilleurs résultats.
- Les couplages peptidiques réalisés avec le Fmoc pris comme groupement protecteur sont plus efficaces. De ce fait, lors de la synthèse du trimère GalNAc *N*-Fmoc **4.11**, nous n'observons pas, cette fois-ci, la formation majoritaire d'une impureté comme ce fut le cas avec le trimère GalNAc *N*-Cbz **2.37**.

A ce stade, nous avons été en mesure de pouvoir fonctionnaliser ces trimères par un alcyne en position *C*-terminale. Après formation quantitative des acides carboxyliques, ces derniers réagissent avec la propargylamine en utilisant les conditions optimales de couplage peptidique

(Schéma 4.10). Les glycoconjugués mannose **4.12** et GalNAc **4.13** sont obtenus avec des rendements de 86% et de 95%. La déprotection en position *N*-terminale de nos composés est réalisée par traitement en présence d'un mélange Et₂NH/CH₃CN (1:2), à température ambiante pendant 4h. Les glycoconjugués mannose **4.14** et GalNAc **4.15** sont produits quantitativement.

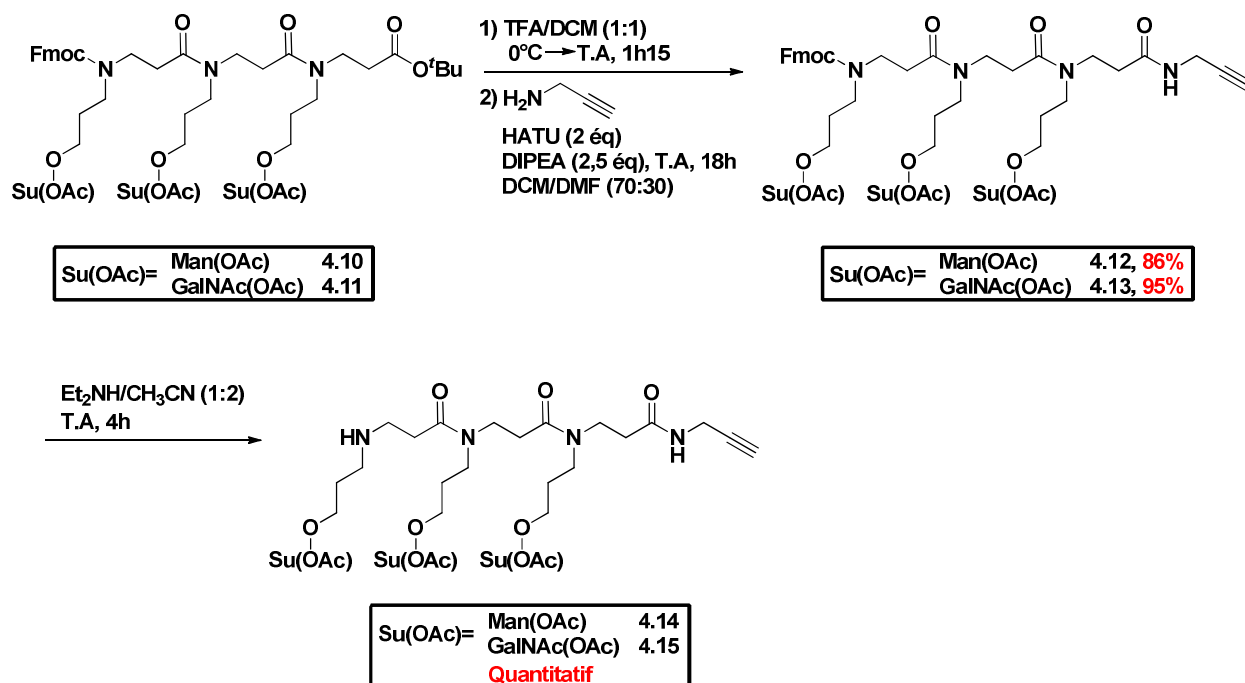
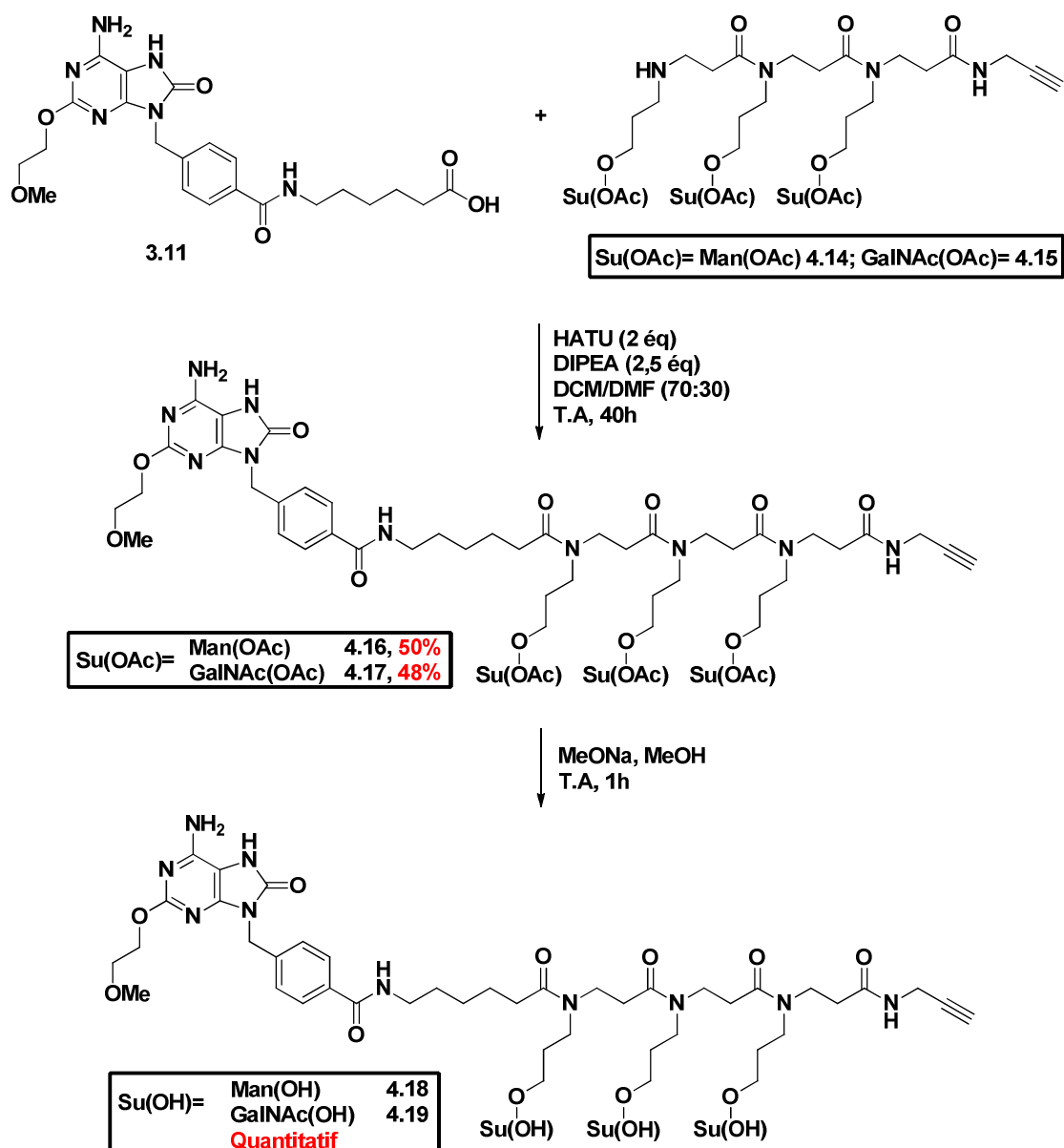


Schéma 4.10: Synthèse des plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées fonctionnalisées par un alcyne.

Nous avons, par la suite, couplé ces trimères **4.14** et **4.15**, avec l'agoniste TLR7 **3.11** conjugué à l'acide amino-caproïque (Schéma 4.11). Les édifices *O*-mannose **4.16** et *O*-GalNAc **4.17** sont respectivement obtenus avec des rendements de 50% et de 48%. Enfin, la désacétylation des sucres dans les conditions de Zemplén, nous a permis de former quantitativement les édifices **4.18** et **4.19** attendus.

Schéma 4.11: Accès aux édifices *O*-glycosylés fonctionnalisés par un alcyne.

Avant d'utiliser le peptide OVA 323-339, nous avons entrepris de vérifier si la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au Cu^{I} était réalisable avec nos édifices fonctionnalisés par un alcyne et présentant des sucres déprotégés. Ainsi un essai de CuAAC a été expérimenté entre l'édifice *O*-mannose **4.18** et l'acide 6-azidohexanoïque. Ce dernier correspond à l'espaceur qui a servi à fonctionnaliser par un groupement azoture le peptide OVA 323-339. Cependant, il nous fallait, au préalable, préparer cet espaceur. Pour ce faire, nous avons fait réagir l'acide 6-

bromohexanoïque commercial avec l'azoture de sodium dans du DMF à 85°C pendant 3h (Schéma 4.12). L'acide 6-azidohexanoïque est alors obtenu avec un rendement de 97%.²⁶³

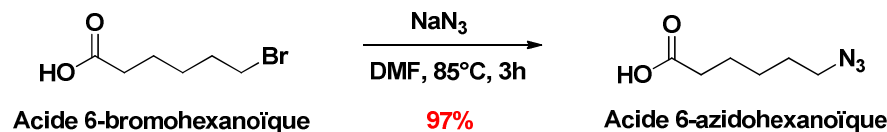


Schéma 4.12: Synthèse de l'acide 6-azidohexanoïque

Pour la réaction de CuAAC, nous avons choisi des conditions aqueuses utilisées par l'équipe de Delmas et Aucagne pour le couplage de peptides (Schéma 4.13A). L'édifice **4.18** (3 mM - 1 éq) et un léger excès d'acide 6-azidohexanoïque (1,2 éq) sont dissouts dans un tampon phosphate à pH 8 (solution à 150 mM). Par la suite, une solution de Cu^(I) (3 éq), est introduite dans le mélange. Celle-ci est préparée à partir d'une solution de CuSO₄.5H₂O (0,5 M) et d'une solution d'ascorbate de sodium (1 M). L'ensemble des solutions aqueuses sont réalisées sous argon et dégazées afin d'éliminer au maximum la présence de dioxygène pouvant altérer la cycloaddition. Avec ces conditions, nous avons observé la disparition complète de l'édifice **4.18** en CCM au bout d'un heure de réaction.

Après élimination des sels de cuivre par centrifugation, la solution aqueuse récupérée est purifiée sur une cartouche SPE de silice greffée C18 et le composé **4.20** est élué avec du MeOH (voir partie expérimentale). Au final le produit **4.20** issu de la cycloaddition est obtenu avec un rendement de 70% (Schéma 4.13B). Nous pouvons alors conclure que la réaction de CuAAC peut être adaptée à nos édifices fonctionnalisés par un alcynes.

²⁶³ Grandjean, C.; Boutonnier, A.; Guerreiro, C.; Fournier, J-M.; Mulard, L. A. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 7123-7132.

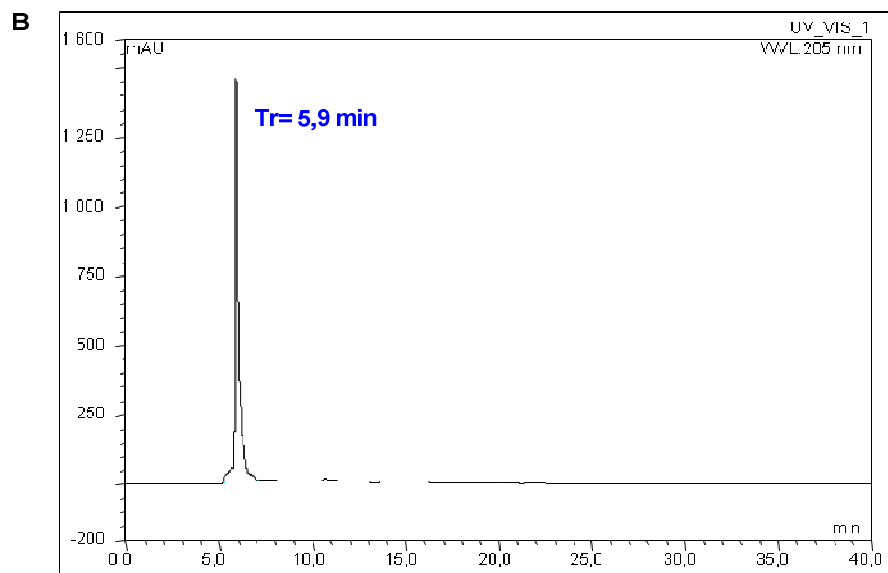
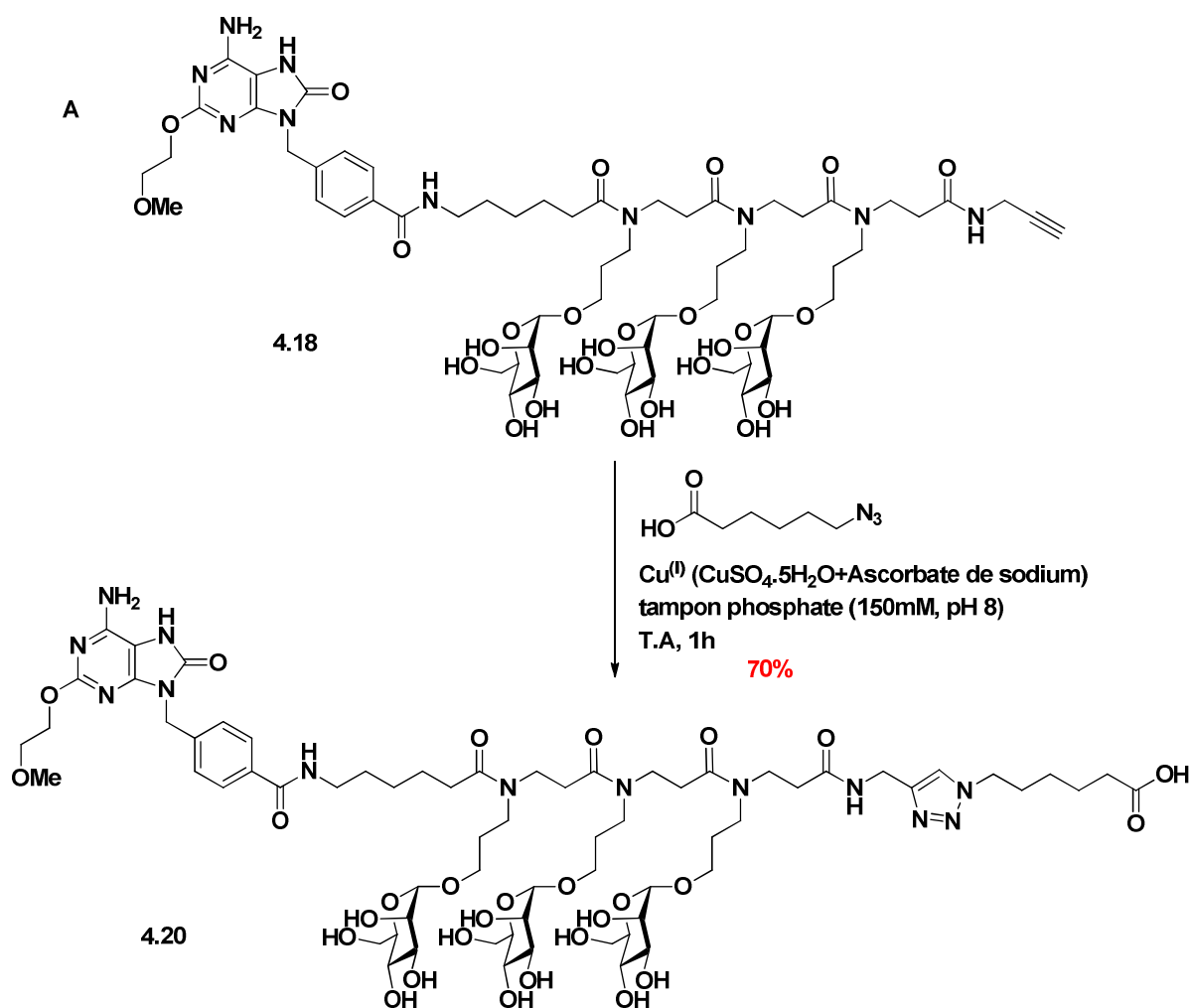


Schéma 4.13: Synthèse de l'édifice 4.20. A) Conditions réactionnelles et résultats; B) Chromatogramme HPLC (MeOH/H₂O (0,1% TFA) 90:10; 205 nm).

C. Essais avec le peptide fonctionnalisé par un azoture

Les conditions standards utilisées ci-dessus pour la réaction de CuAAC, ne sont pas toujours compatibles avec la bioconjugaison de peptides. En effet, l'association dans un milieu des ions cuivre et de l'ascorbate de sodium, même en condition anaérobie, peut être à l'origine de réactions indésirables au niveau des chaînes latérales non protégées de certains acides aminés. De manière générale, l'ascorbate de sodium est un agent réducteur de choix qui permet de réduire les ions $\text{Cu}^{(\text{II})}$ en $\text{Cu}^{(\text{I})}$. Cependant, celui-ci peut également réduire l'oxygène moléculaire résiduel, entraînant la formation d'espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène.²⁶⁴ Suivant une réaction de Fenton ou d'Haber-Weiss, cette espèce permet l'obtention du radical hydroxyle (HO^\bullet). Les espèces réactives de l'oxygène, et plus particulièrement HO^\bullet , peuvent oxyder certaines chaînes latérales sensibles d'acides aminés tels que la cystéine, la méthionine ou l'histidine. Ainsi, certains groupes ont mis en évidence l'oxydation du noyau imidazole de l'histidine en 2-imidazolone par action du radical hydroxyle.^{265,266,267} Ce dernier présente aussi la faculté de pouvoir dégrader les protéines et les peptides. Les produits issus de l'oxydation de l'ascorbate de sodium, notamment le déhydroascorbate et le glyoxal, peuvent interagir avec la cystéine, la lysine ou l'arginine. Ceci aboutit à la modification de la structure de leur chaîne latérale^{268,269} ou à la formation d'un lien covalent entre elles.²⁷⁰

Le peptide OVA 323-339 possède trois acides aminés sensibles (deux histidines et une arginine). Finn a montré²⁷¹ que l'emploi d'un excès de ligand hydrophile de la famille des

²⁶⁴ Baker, W. L.; Goode, J.; Cooper, L. Estimation of Hydrogen Peroxide Formed and Residual Ascorbate in the Copper Catalysed Oxidation Reaction of Ascorbate. *Mikrochimica Acta* **1992**, 106, 143-152.

²⁶⁵ Uchida, K.; Kawakishi, S. Selective Oxidation of Imidazole Ring in Histidine Residues by the Ascorbic Acid - Copper Ion System. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1986**, 138, 659-665.

²⁶⁶ Schöneich, C. Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2000**, 21, 1093-1097.

²⁶⁷ Liu, Y.; Sun, G.; David, A.; Sayre, L. M. Model Studies on the Metal-Catalyzed Protein Oxidation: Structure of a Possible His-Lys Cross-Link. *Chemical Research in Toxicology* **2004**, 17, 110-118.

²⁶⁸ Thornalley, P. J. Glutathione-dependent detoxification of α -oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferation activity of glyoxalase I inhibitors. *Chemico-Biological Interactions* **1998**, 111-112, 137-151.

²⁶⁹ Shangari, N.; Chan, T. S.; Chan, K.; Wu, S. H.; O'Brien, P. J. Copper-catalyzed ascorbate oxidation results in glyoxal/AGE formation and cytotoxicity. *Molecular Nutrition & Food Research* **2007**, 51, 445-455.

²⁷⁰ Nagaraj, R. H.; Sell, D. R.; Prabhakaram, M.; Ortwerth, B. J.; Monnier, V. M. High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, 88, 10257-10261.

²⁷¹ Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48, 9879-9883.

polytriazolylamines,²⁷² tel que le THPTA permettait l'interception rapide des espèces réactives de l'oxygène. De plus, ce type de ligand peut former un complexe stable et protecteur avec les ions Cu^(I), ce qui les maintient sous cet état d'oxydation^{272,273} et empêche leur interaction avec les azotes présents sur les imidazoles des histidines.²⁷⁴ Tout ceci favorise l'accélération de la réaction de cycloaddition. L'équipe de Finn a également montré l'intérêt d'utiliser un excès de chlorhydrate d'aminoguanidine afin d'intercepter efficacement les produits issus de l'oxydation de l'ascorbate de sodium. De plus, il est en général préférable de se placer dans des conditions anaérobiques.²⁷⁵

L'ensemble des solvants employés ont préalablement été désoxygénés à travers plusieurs cycles vide (à 15 mbar)/argon et toutes les réactions de cycloadditions ont été effectuées sous argon dans un tampon HEPES ("*Good's buffer*").²⁷⁶ Celui-ci présente l'avantage, par rapport au tampon phosphate, d'avoir une faible affinité pour les ions Cu^(II),²⁷⁷ ce qui limite leur précipitation. Un premier essai a donc été réalisé en utilisant l'édifice *O*-mannosylé **4.18** (Schéma 4.14A). Cet édifice ainsi que le peptide OVA 323-339 ont, dans un premier temps, été dissouts dans un mélange contenant un tampon HEPES (100 mM et à pH 7,5), de l'eau ultrapure et HFIP. L'ajout d'eau ultrapure et du solvant organique HFIP, favorise la solubilisation de nos composés et plus particulièrement du peptide. L'utilisation du tampon HEPES seul, n'étant pas suffisante. D'autres solvants organiques ont également été testés, tels que MeOH et DMF, mais ils n'ont pas permis d'aboutir à une solubilisation complète du peptide. L'une des conséquences dans l'emploi du solvant HFIP est l'acidification du milieu réactionnel, pouvant inhiber la réaction de CuAAC. De ce fait avant de débiter la réaction, il était nécessaire d'ajuster de nouveau le pH à 7,5 à l'aide d'une solution aqueuse NaOH à 0,5 N. Au final, dans le milieu réactionnel, l'édifice *O*-mannosylé **4.18** et le peptide OVA 323-339 (1 éq chacun) présentaient une concentration de 5 mM. En parallèle, nous avons préparé une solution catalytique aqueuse contenant le

²⁷² Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Organic Letters* **2004**, 6, 2853-2855.

²⁷³ Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3+2] Cycloaddition. *Journal of American Chemical Society* **2003**, 125, 3192-3193.

²⁷⁴ Gaulier, C.; Hospital, A.; Legeret, B.; Delmas, A. F.; Aucagne, V.; Cisnetti, F.; Gautier, A. A water soluble Cu^I-NHC for CuAAC ligation of unprotected peptides under open air conditions. *Chemical Communications* **2012**, 48, 4005-4007.

²⁷⁵ Kumar, A.; Li, K.; Cai, C. Anaerobic conditions to reduce oxidation of proteins and to accelerate the copper-catalyzed "Click" reaction with a water-soluble bis(triazole) ligand. *Chemical Communications* **2011**, 47, 3186-3188.

²⁷⁶ Good, N. E.; Winget, D.; Winter, W.; Connolly, T. N.; Izawa, S.; Singh, R. M. M. *Hydrogen Ion Buffers for Biological Research* **1966**, 5, 467-477.

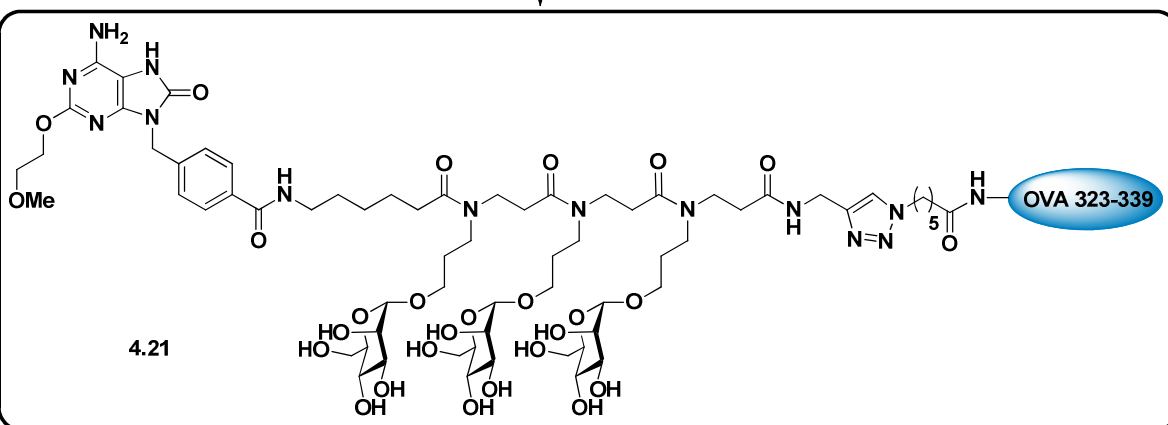
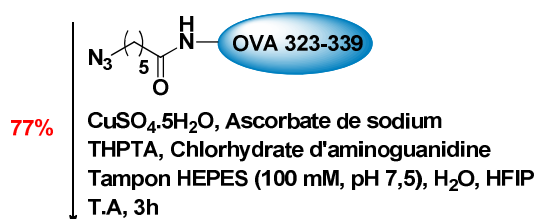
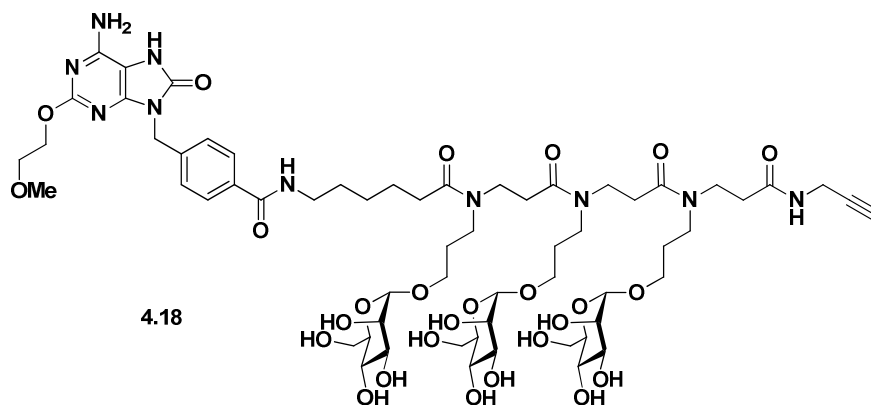
²⁷⁷ Sokolowska, M.; Bal, W. Cu(II) complexation by "non-coordinating" N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005**, 99, 1653-1660.

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 éq), l'ascorbate de sodium (4 éq), le THPTA (6 éq) et le chlorhydrate d'aminoguanidine (5 éq). Celle-ci est directement injectée dans le milieu réactionnel.

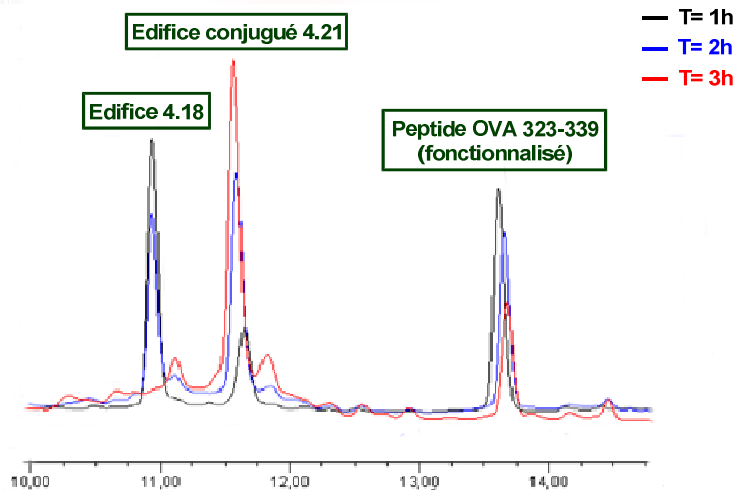
L'évolution de la réaction de CuAAC a été suivie par HPLC analytique (Schéma 4.14B). Après 1h de réaction, nous avons alors remarqué la présence significative du peptide OVA 323-339 ($T_r = 13,7$ min) et de l'édifice **4.18** ($T_r = 10,7$ min). Cependant, nous avons également observé l'apparition d'un nouveau produit minoritaire ($T_r = 11,6$ min) que l'on supposait être le produit final **4.21** attendu. Afin d'accélérer l'avancement de la réaction de CuAAC, nous avons décidé d'injecter une nouvelle fois de la solution catalytique contenant les mêmes quantités en THPTA (6 éq) et en chlorhydrate d'aminoguanidine (5 éq) mais avec des quantités doublées en $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 éq) et en ascorbate de sodium (8 éq).

Une heure après cette seconde injection, nous avons observé par HPLC l'augmentation en intensité (mAU) du nouveau produit et la diminution en intensité du peptide ainsi que de l'édifice *O*-mannosylé **4.18** ($T = 2\text{h}$). Néanmoins, les trois produits présentaient la même intensité. Pour finaliser la cycloaddition, nous avons ajouté au milieu réactionnel un mélange aqueux constitué uniquement de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 éq) et d'ascorbate de sodium (8 éq). Un dernier suivi par HPLC ($T = 3\text{h}$), a mis en évidence la présence très majoritaire du nouveau produit avec disparition totale de l'édifice **4.18**. Nous avons donc pris la décision d'arrêter la cycloaddition en introduisant dans le milieu une solution aqueuse contenant 0,5% de TFA. Ce milieu réactionnel est directement purifié sur une cartouche SPE de silice greffée C18 à l'aide d'un gradient de solvants $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (voir partie expérimentale). Après avoir éliminé un maximum de réactifs et d'impuretés tels que le cuivre, l'ascorbate de sodium (et certains de ces sous produits d'oxydation), le THPTA et le chlorhydrate d'aminoguanidine, nous sommes parvenus à isoler le nouveau produit ($T_r = 11,6$ min).

A



B


 Schéma 4.14: Synthèse de l'édifice tripartite *O*-mannose 4.21:

A) Conditions et résultats de la réaction de CuAAC; B) Suivi réactionnel par HPLC analytique (Gradient: A: H₂O (0,1% TEA/H₃PO₄ 1:1 et B: CH₃CN; B augmente de 10% à 60% pendant 30 min-débit de 0,80 mL/min).

Ce produit isolé a été lyophilisé et sa masse a été analysée par ESI-HR-MS (Figure 4.1) et par MALDI-TOF (Figure 4.2). Ces analyses, nous ont permis de conclure que ce produit était bien l'édifice tripartite **4.21** souhaité de masse exacte $M = 3294,6004$ g/mol.

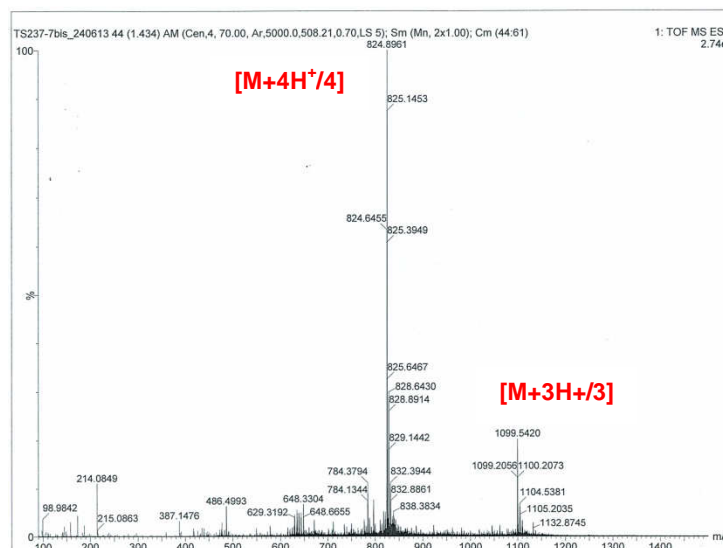


Figure 4.1: HR-MS du composé **4.21**.

En effet, par ESI-HR-MS, nous avons constaté la présence de deux pics caractéristiques de l'édifice trichargé ($[M+3H^+/3]$) et tétrachargé ($[M+4H^+/4]$). Grâce à cette méthode, qui permet l'étude des complexes, nous avons pu vérifier que notre édifice tripartite **4.21** isolé, ne semblait pas être chélaté au cuivre. La technique MALDI-TOF entraîne généralement la formation d'ions monochargés. Ainsi, nous avons détecté la présence de ce type d'ion en rapport avec l'édifice ($[M+H^+]$), au niveau du profil isotopique.

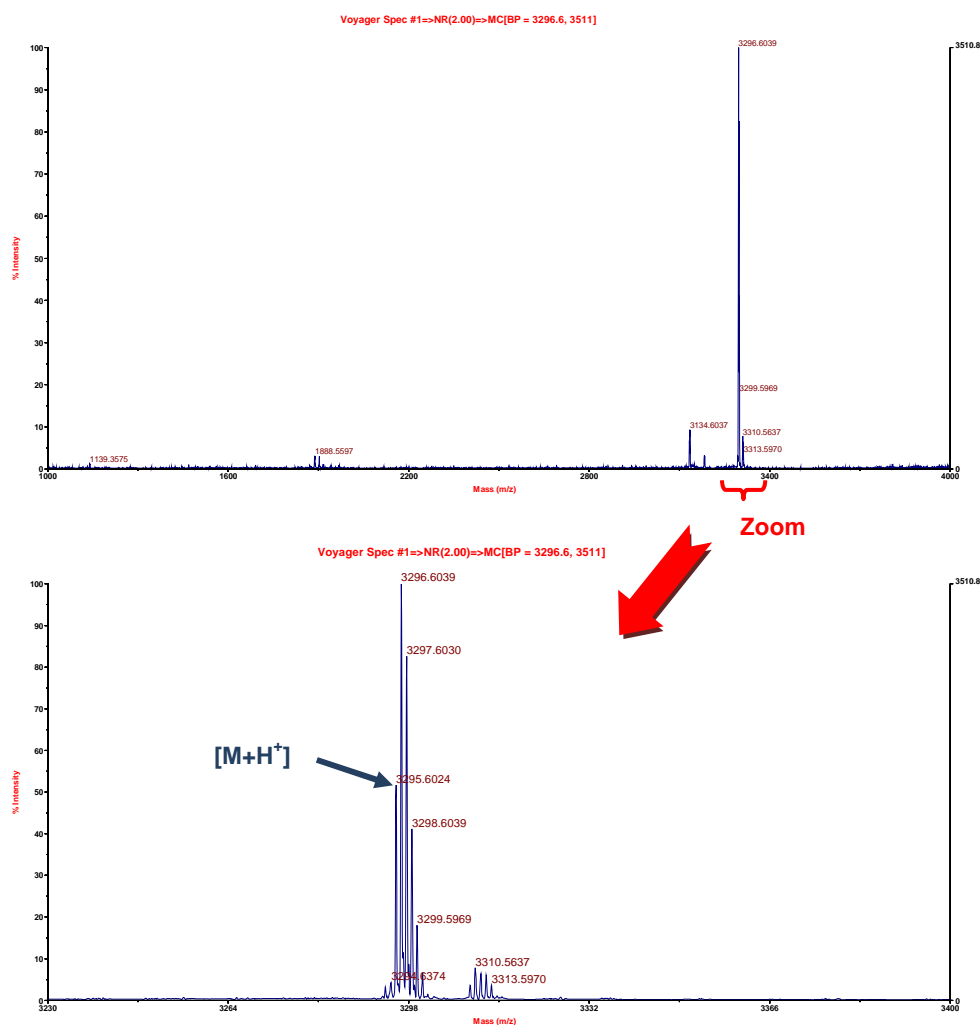


Figure 4.2: MALDI-TOF de l'édifice 4.21.

Ces expériences de masse nous ont également permis d'identifier la présence d'une impureté, qui pourrait correspondre à l'édifice tripartite *O*-mannose dont l'imidazole de l'une de ces histidines est oxydée en 2-imidazolone (3310,5637, soit +17,0027 - Figure 4.2). Finalement, l'édifice **4.21** a été synthétisé avec un rendement de 77% et a été caractérisé par HPLC (Figure 4.3).

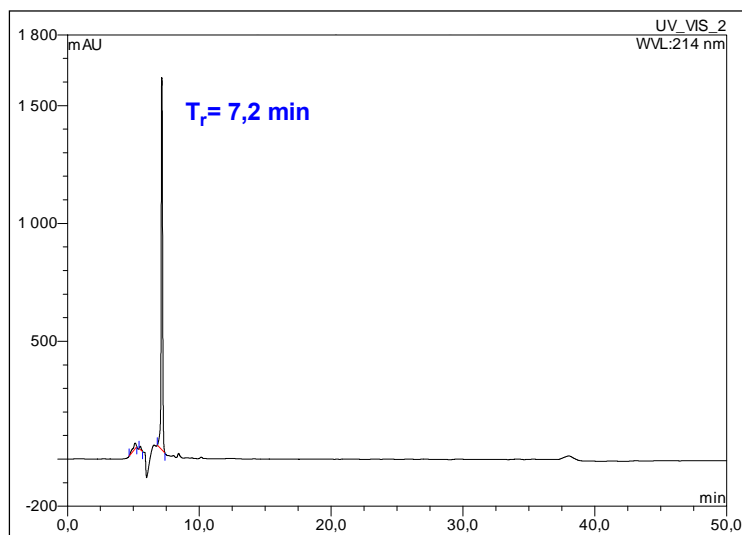


Figure 4.3: Edifice tripartite **4.21** après purification (H_2O (0,1% TFA)/ CH_3CN 70:30; 214 nm).

Les conditions de cycloaddition par CuAAC utilisées, ici, ont donc permis de réaliser efficacement la ligation entre le composé *O*-mannosylé **4.18** et le peptide OVA 323-339 fonctionnalisé par un azoture. Ces conditions ont pu être utilisées avec le composé *O*-GalNAc **4.19** (Schéma 4.15). Cependant, nous avons pris la décision d'apporter certaines améliorations. En premier lieu, afin de diminuer le temps de réaction, nous avons introduit directement dans le milieu, une solution catalytique contenant une plus grande quantité en $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 éq), en ascorbate de sodium (8 éq) et en chlorhydrate d'amminoguanidine (10 éq). La quantité en THPTA restant fixée à 6 équivalents. Cette initiative fut concluante puisque nous avons pu arrêter la réaction au bout de 1h15 au lieu de 3h. Par la suite, lors de l'utilisation de la cartouche SPE, nous avons ajouté plusieurs paliers supplémentaires au gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ dans le but d'affiner l'élimination des différents réactifs et impuretés (voir partie expérimentale).

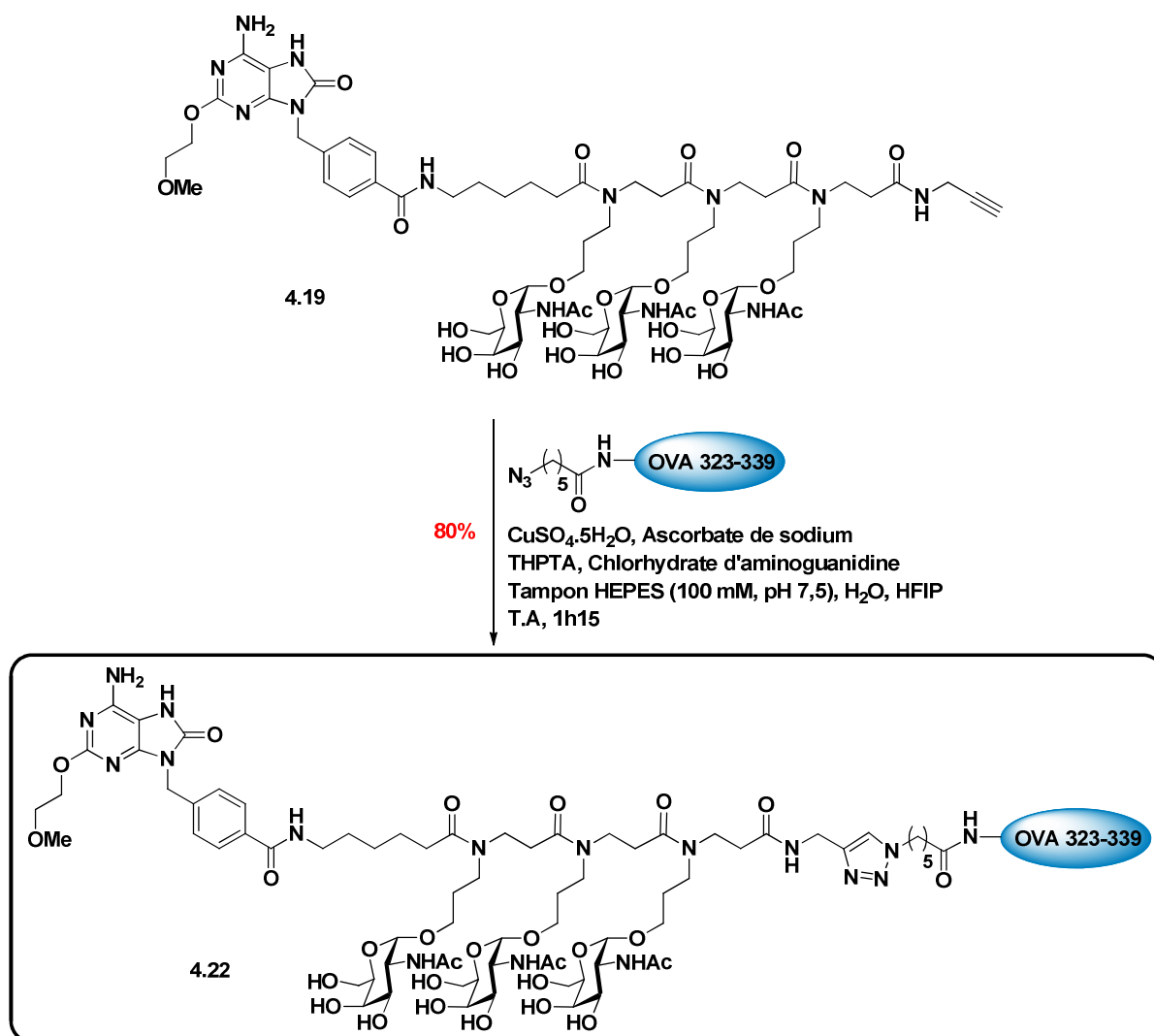


Schéma 4.15: Synthèse de l'édifice tripartite *O*-GalNAc 4.22.

L'édifice tripartite *O*-GalNAc **4.22**, obtenu avec un rendement de 80%, a été caractérisé par HPLC (Figure 4.4).

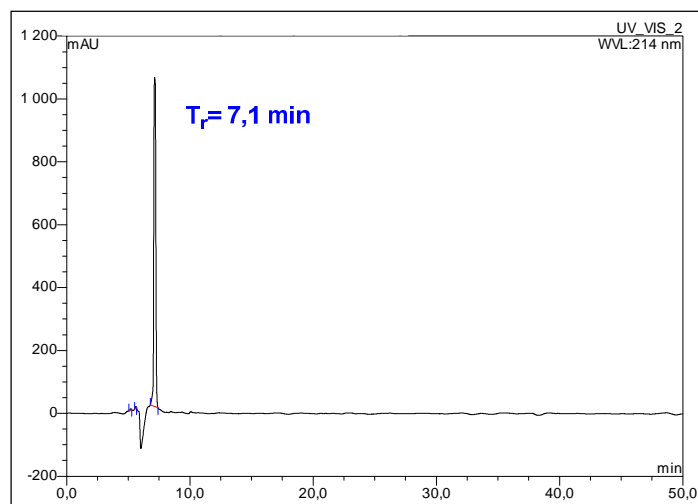


Figure 4.4: Edifice tripartite 4.22 après purification (H_2O (0,1% TFA)/ CH_3CN 70:30; 214 nm).

Ce composé a été analysé par ESI-HR-MS (Figure 4.5 - visualisation des pics $[\text{M}+3\text{H}^+]/3$ et $[\text{M}+4\text{H}^+]/4$) ainsi que par MALDI-TOF (Figure 4.6 - visualisation du pic $[\text{M}+\text{H}^+]$ dans le profil isotopique) dont la masse exacte $M = 3417,6801$ g/mol. Il semblerait que l'impureté issue de l'oxydation de l'une des histidines de l'édifice soit également présente ici (profil isotopique contenant le pic 3434,6072, figure 4.6). Néanmoins, celle-ci paraît moins importante que dans le cas précédent. L'amélioration des résultats en terme de rendement et de pureté pourrait être due aux changements effectués sur les conditions de réaction et/ou sur les conditions de purification.

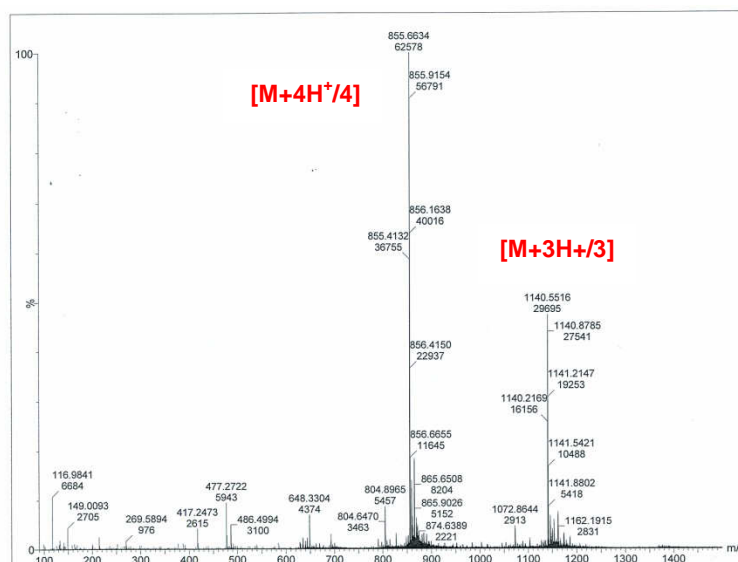


Figure 4.5: HR-MS de l'édifice 4.22.



III. Conclusion de l'étude

Nous nous sommes alors orientés vers le développement d'une stratégie de ligation non native permettant l'établissement d'un lien triazole par cycloaddition azide-alcyne catalysée au cuivre. Pour ce faire, nous avons fonctionnalisé les plateformes glycopeptoïdes par un alcyne et le peptide OVA 323-339 a été acheté avec une fonction azoture à son extrémité *N*-terminale. Le

choix du couple $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /Ascorbate de sodium comme source d'ions $\text{Cu}^{(I)}$, ainsi que la présence, sur le peptide, de trois acides aminés sensibles aux réactions d'oxydations, nous a incité à élaborer des conditions anaérobiques spécifiques incluant l'ajout de THPTA et de chlorure d'amminoguanidine. L'utilisation du tampon HEPES (pH 7,5), du HFIP et de l'eau ultrapure, dans des volumes bien définis, nous a permis de solubiliser nos réactifs mais aussi de nous maintenir à des concentrations et à un pH qui favorisent la cycloaddition. Grâce à tous ces éléments, nous sommes parvenus à synthétiser avec succès l'édifice complexe *O*-mannosylé **4.21**. A l'issue de cette synthèse, des améliorations sur les conditions de réaction et de purification ont pu être mises en place afin de former efficacement le candidat vaccin **4.22**. Dans l'ensemble, les rendements pour ces cycloadditions sont très bons.

Chapitre V: Tests immunologiques

Nous avons synthétisé un candidat vaccin à trois composantes. Ces composantes sont: un agoniste du TLR7 (immuno-adjuvant), une plateforme β -tripeptide *O*- α -GalNAc (épitope B) et le peptide OVA 323-339 (épitope T_H). La plateforme a été générée afin de mimer au mieux le cluster trimérique Tn exprimé à la surface des cellules tumorales. Ce candidat vaccin a été soumis à des évaluations immunologiques effectuées par l'équipe du Pr. Claude Leclerc à l'Institut Pasteur de Paris, et notamment par Richard Lo-Man et par Edith Dériaud. L'objectif de ces tests était de vérifier la fonctionnalité et l'efficacité de chacune des composantes, conjuguées au sein de l'édifice, dans l'activation de leurs cibles respectives conduisant à la production d'une réponse immunitaire spécifique contre l'antigène Tn natif.

Une réponse immunitaire humorale de ce type nécessite la mise en place d'un mécanisme d'action optimal résumé sur la figure 5.1 où trois types de cellules particulières que sont, les DCs, les cellules T_H et les cellules B interviennent.

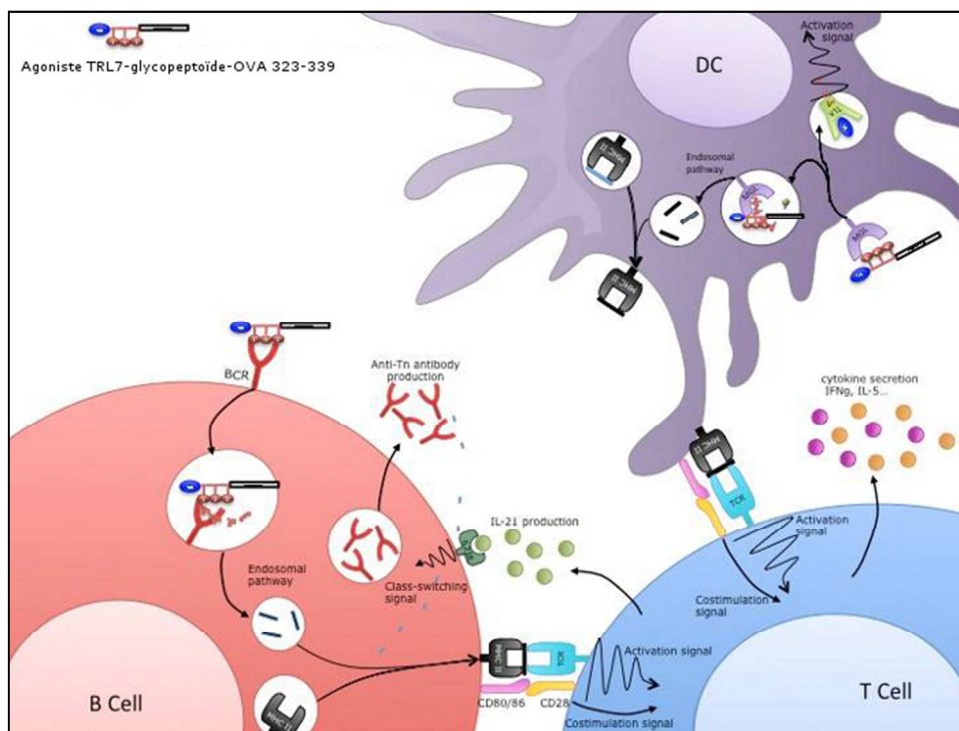


Figure 5.1: Mécanisme d'action du candidat vaccin devant être validé lors des tests immunologiques.

Ce mécanisme peut être explicité de la manière suivante. A l'aide de sa structure mimétique Tn, le candidat vaccin doit être capable de cibler les récepteurs MGLs des DCs. Après internalisation de l'édifice, l'immuno-adjuvant peut s'associer, au niveau des endosomes, à son récepteur TLR7 et générer un signal d'activation conduisant à la maturation des DCs qui peuvent alors libérer des cytokines comme l'IL-6 et l'IL-12 (non représentées sur le schéma). La partie

peptidique de l'édifice (OVA 323-339), dégradée dans les endosomes, est associée aux molécules de classe II du CMH puis l'ensemble est exprimé à la surface cellulaire. La reconnaissance de ce complexe par un récepteur spécifique des cellules T_H naïves (TCR) et l'obtention de molécules de costimulation, entraîne l'activation et la prolifération de ces dernières en lymphocytes T_H CD4⁺. Par ailleurs, au cours de cette phase de la réponse immunitaire et selon le contexte, les cytokines sécrétées par les DCs peuvent favoriser la différenciation phénotypique des cellules T_H en quatre sous-populations possibles. Suivant leurs phénotypes, les cellules T_H produisent alors des cytokines différentes comme par exemple, l'IFN- γ ou l'IL-5. En parallèle, le mime du cluster trimérique Tn exposé par le candidat vaccin peut être également reconnu spécifiquement par des anticorps membranaires (mIg) des cellules B naïves entraînant l'endocytose de l'édifice. Comme pour les DCs, les cellules B sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles: elles peuvent présenter le peptide résultant de la dégradation du peptide OVA 323-339 avec les molécules de classe II du CMH aux lymphocytes T_H activées. Les interactions, d'un côté, avec le candidat vaccin, de l'autre avec les cellules T_H, fournissent des signaux d'activation aux cellules B naïves. De plus, les cytokines libérées par les cellules T_H, permettent la différenciation des cellules B en plasmocytes produisant des IgG de hautes affinités pour le cluster trimérique Tn exprimé à la surface des cellules tumorales.

Ainsi ces évaluations immunologiques, nous ont permis de vérifier si ce mécanisme d'action a bien été mis en place de manière efficiente.

Comme nous l'avons dit précédemment, d'autres structures ont été utilisées pour effectuer ces tests biologiques. Les composés mannosylés nous ont servi de référence ou d'élément de comparaison par rapport aux composés mimant l'antigène Tn. L'ensemble des structures employées et la nomenclature définie par l'Institut Pasteur sont répertoriés dans le tableau 5.1.

Références laboratoire	↔	Références Institut Pasteur
Composé 3.11		R7Link
Composé 2.40		GalNAc3
OVA 323-339		OVA2
Composé 3.15		R7Man3
Composé 3.16		R7GalNAc3
Composé 4.21		R7Man3OVA2
Composé 4.22 (candidat vaccin)		R7GalNAc3OVA2

Tableau 5.1: Nomenclature des composés utilisée lors des tests immunologiques.

Désormais, nous utiliserons cette nomenclature pour décrire l'ensemble des résultats obtenus. Les tests immunologiques *in vitro* et *in vivo* (chez la souris) comprennent des mesures de l'adjuvantité, de l'antigénité et de l'immunogénité des composantes de l'édifice candidat vaccin complexe R7GalNAc3OVA2.

I. Tests immunologiques *in vitro*

A. Tests d'adjuvantité

L'intérêt de ces mesures était de vérifier si une maturation efficace des DCs est obtenue, grâce à la présence de l'hétérocycle aromatique utilisé comme agoniste du récepteur TLR7 au sein de l'édifice candidat vaccin. Pour ce faire, des cellules de la moelle osseuse d'une souris C57BL/6 ont été prélevées et mises en culture en présence du facteur GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), à 37°C pendant 6 jours (Figure 5.2). Les BMDCs (*Bone Marrow derived Dendritic Cells*) ont ensuite été récupérées puis stimulées par plusieurs de nos composés fournis. Au bout de 48h d'incubation, les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12 ont été dosées à l'aide d'une technique variante de l'ELISA. Cette variante, appelée sandwich, permet de quantifier dans un surnageant de culture, une cytokine produite, par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques de celle-ci (Voir partie expérimentale).

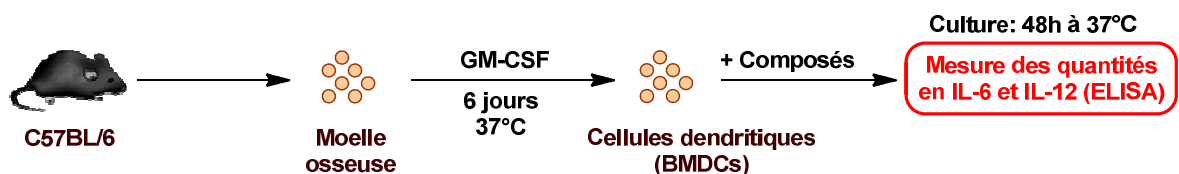


Figure 5.2: Méthode utilisée *in vitro* pour mesurer la réponse inflammatoire.

La production des cytokines IL-6 et IL-12 est le reflet d'une activation efficace des récepteurs TLR7 et donc d'une maturation des DCs. Les résultats présentés sur la Figure 5.3, montrent la concentration en IL-12p40 (p40 étant une unité de IL-12 comme p70 - Figure 5.3a) ou en IL-6 (Figure 5.3b), en fonction de la concentration en composés testés.

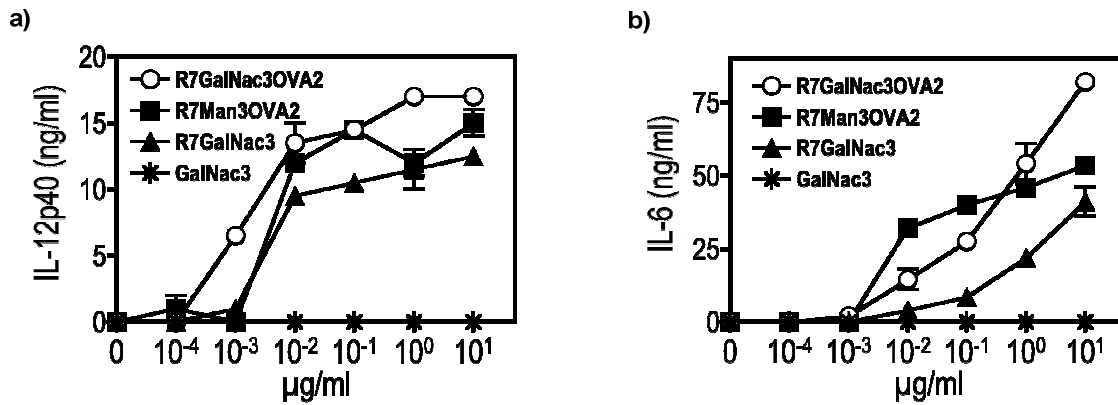


Figure 5.3: Résultats *in vitro* des tests d'adjuvantité. a) Dosage de IL-12; b) Dosage de IL-6.

Comme on pouvait s'y attendre, tous les composés conjugués à TLR7 ont permis la production de ce type de cytokine. De manière générale, les plus importantes quantités en cytokines ont été obtenues en stimulant les DCs avec l'édifice candidat vaccin R7GalNac3OVA2. Par ailleurs, il semblerait que la présence du peptide OVA 323-339, favorise la sécrétion de ces cytokines. La mesure de ces réponses inflammatoires nous ont donc permis de mettre en évidence la propriété immuno-adjuvante de l'agoniste de TLR7 choisi, au sein de l'édifice complexe. Dans le cas des molécules conjuguées à des résidus α -GalNac, l'obtention de telles réponses inflammatoires sous-entend qu'elles ont interagi, au préalable, avec le récepteur MGL des DCs. Le composé mannosylé, quant à lui, a pu pénétrer à l'intérieur des DCs grâce à d'autres récepteurs lectines de type C.

B. Tests d'antigénicité T

L'objectif, ici, était de vérifier si la stimulation des DCs permettait la présentation du peptide OVA entraînant l'activation des cellules T_H, caractérisée par une prolifération de ces dernières suivie d'une production de cytokine. Pour ce faire, des lymphocytes T (LT) ont été isolés des ganglions de souris OT2 (Figure 5.4). Ce sont des souris transgéniques qui expriment le récepteur TCR spécifique du peptide OVA 323-339. Les lymphocytes T obtenus ont été marqués au CFSE (*CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester*) qui est un composé fluorescent, non toxique émettant dans le canal FITC. Les BMDCs de souris C57BL/6, générées comme précédemment, et les lymphocytes T CD4⁺ OT2 ont été, par la suite, mis en co-culture. A ce milieu, différentes concentrations en composés ont été ajoutées. Après 72h d'incubation à 37°C, la prolifération des cellules T CD4⁺ a été mesurée au FACS par cytométrie en flux.

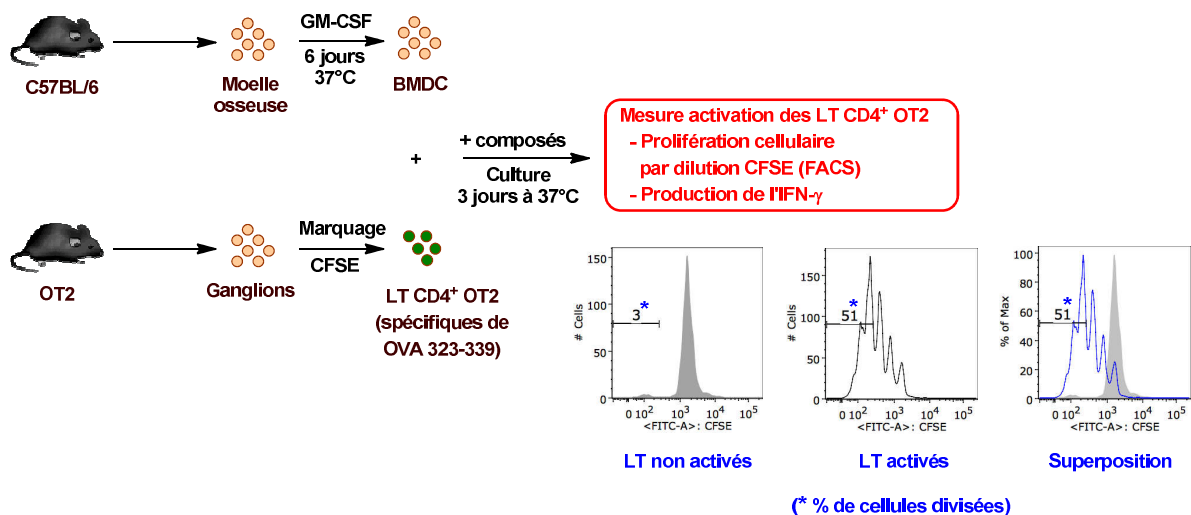
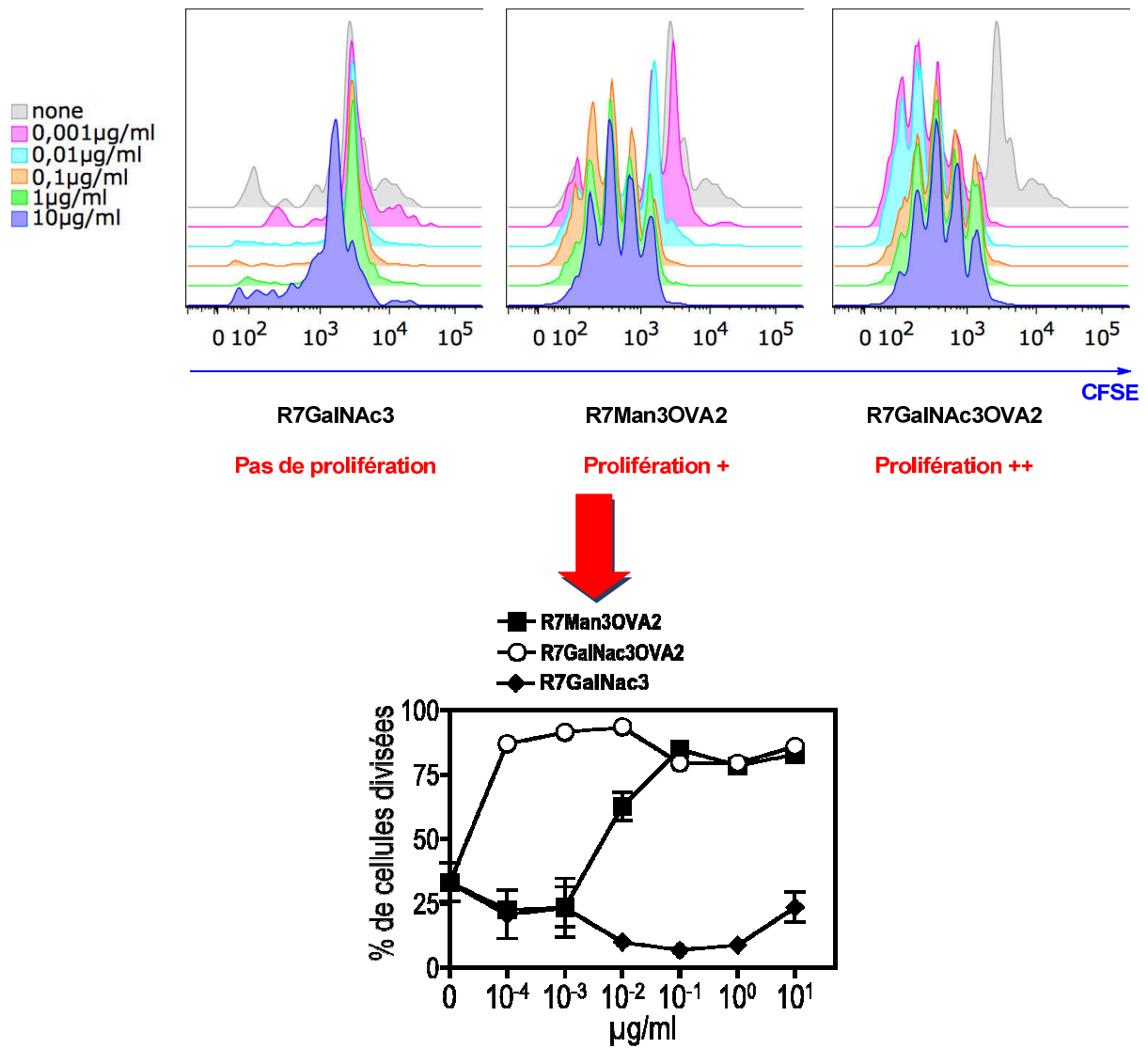


Figure 5.4: Méthode utilisée *in vitro* pour mesurer l'activation des LT CD4⁺ OT2.

Pour caractériser cette prolifération, il est nécessaire de savoir qu'au cours de chaque division cellulaire, l'intensité de fluorescence diminue de moitié, ce qui permet de déterminer au FACS le nombre de divisions cellulaires et le nombre de cellules en division. Sur la Figure 5.4, sont représentés les profils graphiques généralement obtenus pour des cellules non activées ou pour des cellules activées. La fluorescence de base des cellules non activées diffère de celle des cellules activées. Cette dernière décroît progressivement et présente plusieurs pics en autant de divisions cellulaires.

Les résultats ont montré que la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ OT2 a été fortement induite par les édifices complexes intégrant le peptide OVA 323-339 (Figure 5.5). Ce dernier a donc été digéré par les DCs et le peptide antigénique résultant a bien été présenté, avec les molécules de classe II du CMH, aux lymphocytes T CD4⁺, favorisant leur prolifération. On peut également ajouté qu'il existe un réel bénéfice de la glycosylation avec le résidu GalNAc, comparé à celle avec le mannose. En effet, aux faibles concentrations, l'édifice R7GalNAc3OVA2 a induit une forte prolifération (aux alentours de 80%) alors qu'à ces mêmes concentrations, le composé R7Man3OVA2 n'a pratiquement pas engendré de divisions cellulaires.


 Figure 5.5: Résultats *in vitro* des mesures de prolifération des LT CD4⁺ OT2.

Par la suite, une mesure de la quantité en cytokine IFN- γ produite par les cellules T CD4⁺ activées a été effectuée (Figure 5.6). La détection et le dosage de cette cytokine ont été réalisés dans le surnageant de culture par la même technique que pour l'IL-6 et l'IL-12. Les lymphocytes T stimulés par les édifices intégrant le peptide OVA 323-339 ont ainsi sécrété de l'IFN- γ sans réel bénéfice entre les deux types de glycosylation.

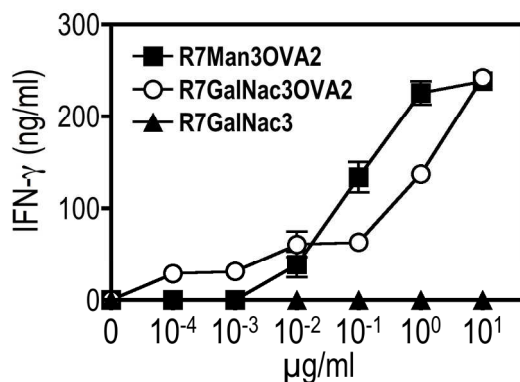


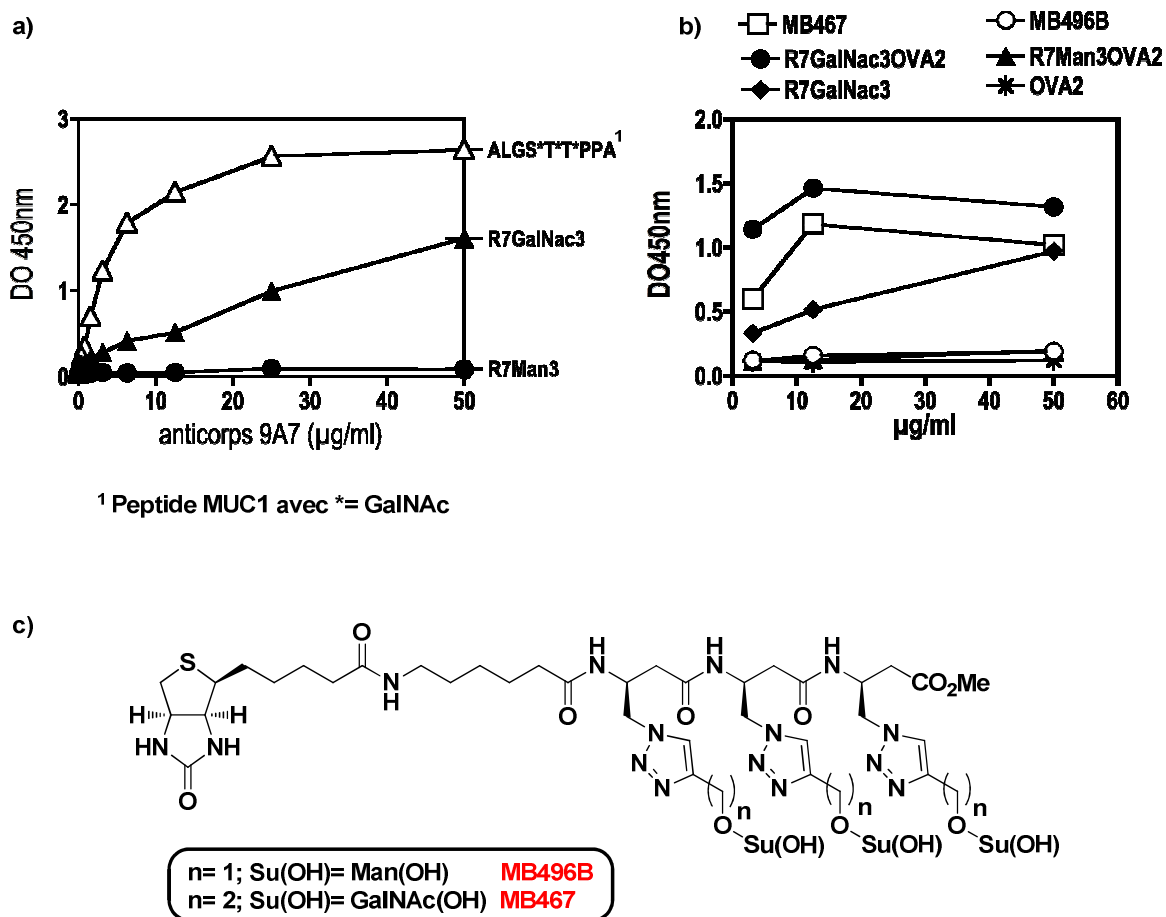
Figure 5.6: Résultats des mesures *in vitro* de l'IFN-γ.

C. Tests d'antigénicité B

Ces tests ont consisté à vérifier si notre mime du cluster trimérique Tn, correspondant à la plateforme β -tripeptide O - α -GalNAc, est reconnu efficacement par l'anticorps anti-Tn 9A7 obtenu par l'équipe du Pr. Claude Leclerc.²⁷⁸ Une variante de la technique ELISA a été mise en place pour effectuer ces tests d'antigénicité. Elle consiste à immobiliser sur une microplaque, par interaction électrostatique, différentes concentrations des édifices choisis. De manière générale, après s'être lié aux édifices, l'anticorps 9A7 peut être reconnu par un second anticorps couplé à la peroxydase de raifort (HRP), qui en présence de son substrat libère un produit coloré. De ce fait, la densité optique (DO) mesurée à 450 nm est proportionnelle à la reconnaissance des différents composés par l'anticorps 9A7. Les résultats sont définis sur la figure 5.7. Dans chaque cas, la densité optique est décrite en fonction de la concentration en anticorps 9A7.

Nous avons alors remarqué que la reconnaissance du composé R7GalNAc3 est moins forte que celle du peptide MUC1 (ALGS*T*T*PPA) de référence exposant un cluster trimérique Tn sur un squelette Ser-Thr-Thr (Figure 5.7a). Sur la figure 5.7b, ont été représentés les résultats obtenus pour nos composés fournis et pour certaines structures synthétisées par Marielle Barra qui fut en thèse auparavant au laboratoire (Figure 5.7c). Ces structures correspondent à des plateformes β -tripeptides O - α -mannose (MB496B) et O - α -GalNAc (MB467). Elles ont été biotinylées afin d'être immobilisées sur une microplaque pré-coatée par de la streptavidine.

²⁷⁸ Mazal, D.; Lo-Man, R.; Bay, S.; Pritsch, O.; Dériaud, E.; Ganneau, C.; Medeiros, A.; Ubillos, L.; Obal, G.; Berois, N.; Bollati-Fogolin, M.; Leclerc, C.; Osinaga, E. Monoclonal antibodies toward different Tn-amino acid backbones display distinct recognition patterns on human cancer cells. Implications for effective immuno-targeting of cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2013**, 62, 1107-1122.

Figure 5.7: Résultats des tests *in vitro* d'antigénicité B.

On a alors pu constater que le composé R7GalNac3 présentait une moins bonne reconnaissance anticorps que la structure MB467. Quant à l'édifice candidat vaccin complexe R7GalNac3OVA2, la fixation de l'anticorps a paru bien meilleure que celle du composé R7GalNac3, et légèrement supérieure à celle du produit MB467. Néanmoins, ces résultats doivent être interprétés avec beaucoup de précaution. En effet, ils sont directement influencés par les propriétés d'adsorption des composés sur la microplaque. D'un côté, il est reconnu que les produits biotynlés se fixent fortement à la microplaque et de l'autre, il est possible de penser que le peptide OVA 322-339 pourrait faciliter la fixation du candidat vaccin sur celle-ci. Ainsi, ces résultats semblent indiquer un mimétisme partiel de l'antigène Tn naturel par notre plateforme β -tripeptide *O*- α -GalNac. Afin de s'assurer de la teneur de ces résultats, nous synthétisons actuellement les mêmes plateformes β -tripeptides *O*- α -glycosylées, mais cette fois-ci, biotinylées.

Conclusion sur ces tests immunologiques *in vitro*

Par conséquent, malgré une reconnaissance existante mais modérée de notre mime du cluster trimérique Tn, nous sommes parvenus à obtenir de manière efficiente une maturation des DCs ainsi qu'une activation des cellules T_H. Ces tests *in vitro* sont donc concluants et nous ont permis de valider la fonctionnalité des trois composantes conjuguées au sein du candidat vaccin R7GalNAc3OVA2. Grâce à ces résultats, il nous a été possible d'effectuer des tests *in vivo*.

II. Tests immunologiques *in vivo*

A. Tests d'adjuvantité

Des souris C57BL/6 ont été, dans un premier temps, immunisées soit avec les édifices complexes (R7GalNAc3OVA2 ou R7Man3OVA2) soit avec le peptide OVA 323-339 (Figure 5.8) à raison de 11,7 nmol par souris. Après 24h, une saignée a été effectuée et une mesure de la réponse inflammatoire dans le sérum, c'est-à-dire de la production des cytokines IL-6 et IL-12, a été réalisée à l'aide de la technique ELISA type sandwich.

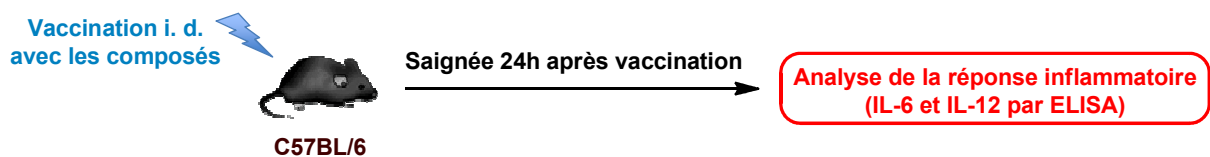


Figure 5.8: Méthode utilisée *in vivo* pour détecter la réponse inflammatoire.

Les résultats obtenus (Figure 5.9), ont mis en évidence la présence de ces cytokines induites par le candidat vaccin. De ce fait, celui-ci présente la capacité *in vivo*, de cibler les DCs (par les récepteurs MGLs) et d'activer le récepteur TLR7 par l'intermédiaire de l'hétérocycle aromatique incorporé. Ceci permet la maturation des DCs responsables d'une réponse inflammatoire appropriée. L'immuno-adjuvantité de l'agoniste de TLR7 intégré dans l'édifice candidat vaccin complexe a donc été validée. Par ailleurs, une réponse inflammatoire a également été observée avec le composé mannosylé.

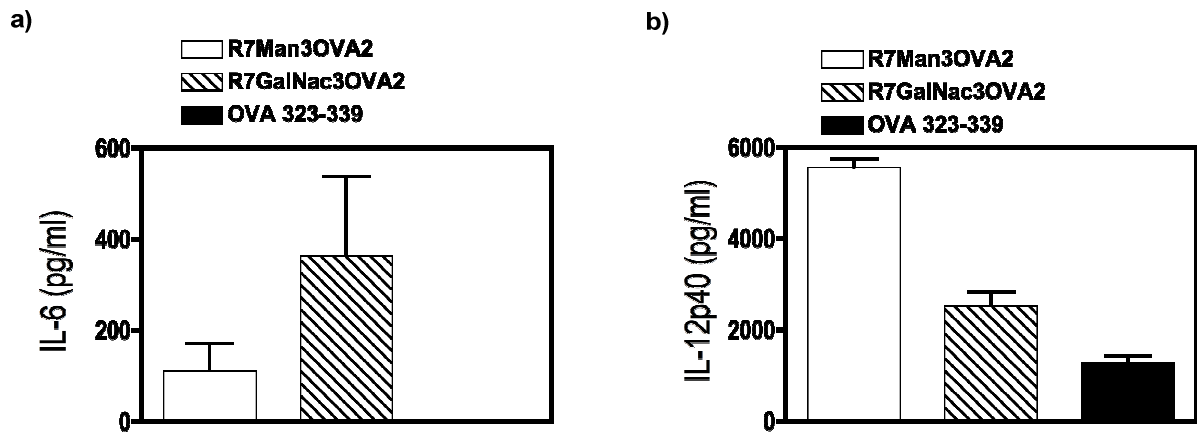


Figure 5.9: Résultats *in vivo* des tests d'adjuvantivité. a) Dosage de IL-12; b) Dosage de IL-6.

B. Tests d'immunogénicité T

Comme dans le cas des tests *in vitro*, l'objectif était de s'assurer d'une activation *in vivo* des lymphocytes T CD4⁺ en présence du candidat vaccin. Des lymphocytes T CD4⁺ venant des ganglions de souris transgéniques OT2 ont été, au départ, injectés à des souris C57BL/6. Celles-ci ont été, par la suite, immunisées par voie intradermique (i.d.) avec différents composés (Figure 5.10). Après 5 jours d'incubation, la rate et les ganglions ont été prélevés afin de mesurer la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ OT2 au FACS par cytométrie en flux ainsi que la production de cytokine IFN- γ .

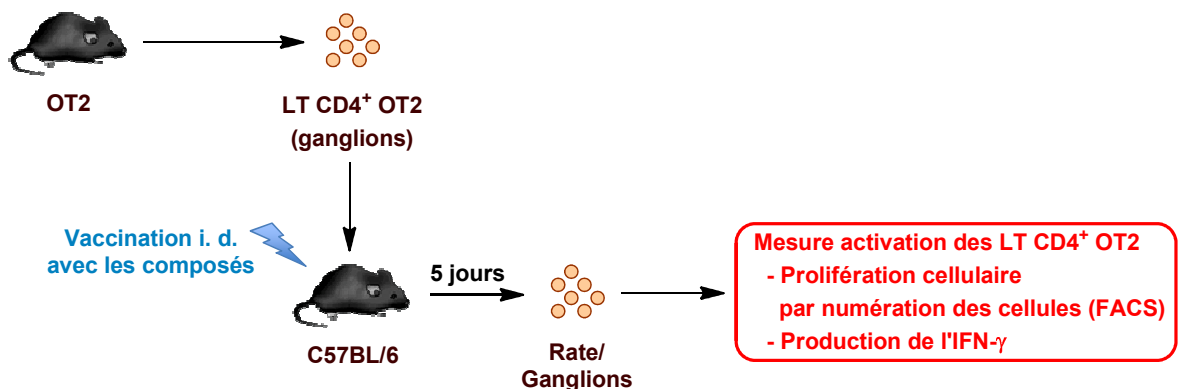


Figure 5.10: Méthode utilisée *in vivo* pour analyser l'activation des LT CD4⁺ OT2.

Nous avons pu constater que le candidat vaccin R7GalNac3OVA2 induisait, grâce à la composante OVA, une prolifération importante des lymphocytes T CD4⁺ (Figure 5.11a). Dans la

population $CD4^+$, nous avons effectué par FACS le comptage des lymphocytes T $CD4^+$ OT2 qui sécrètent l'IFN- γ (Figure 5.11b).

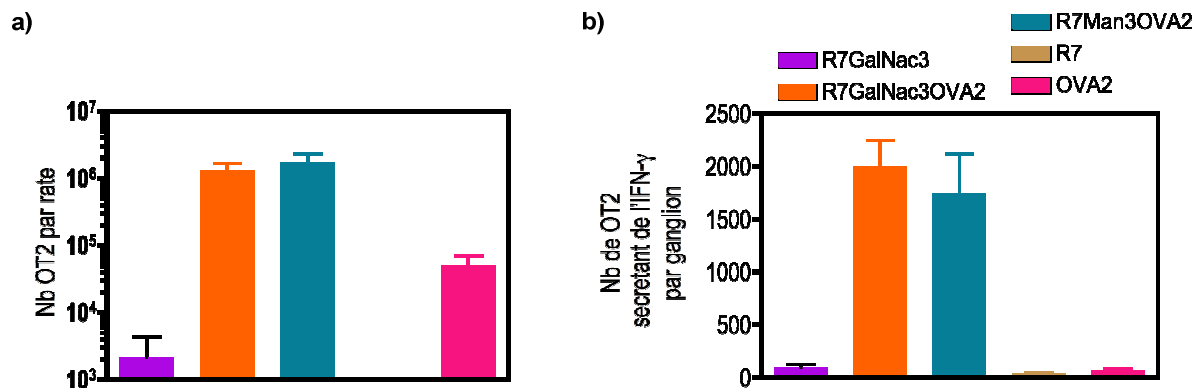


Figure 5.11: Résultats de l'immunogénicité T. a) Mesure de la prolifération des LT $CD4^+$ OT2 dans la rate; b) Mesure des LT $CD4^+$ OT2 produisant l'IFN- γ .

Ensuite les cellules de la rate, prélevées précédemment, ont été restimulées dans un milieu de culture, en présence ou en absence du peptide OVA 323-339. Cette expérience a permis de mesurer par ELISA, la quantité d'IFN- γ produite par les lymphocytes T $CD4^+$ OT2 activés *in vivo* (Figure 5.12a). Nous avons alors pu détecter la sécrétion de l'IFN- γ dans le milieu en présence du peptide OVA dans le cadre d'une immunisation préalable avec le candidat vaccin. Une recherche de la cytokine IL-5 a également été entreprise, sans résultat (Figure 5.12b).

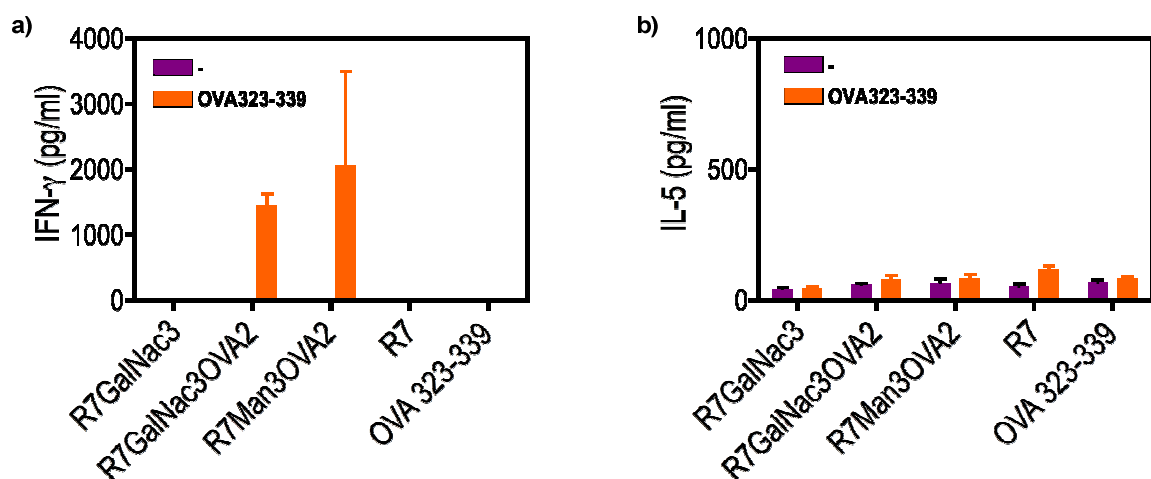


Figure 5.12: Résultats des productions de cytokines par les LT $CD4^+$ OT2 activés. a) Dosage de l'IFN- γ ; b) Dosage de l'IL-5.

Le type de cytokine libéré par les lymphocytes T $CD4^+$ OT2 activés renseigne sur l'orientation phénotypique de ces mêmes cellules. En général, les cellules qui se différencient en

lymphocytes T_{H1} produisent l'IFN- γ . La sécrétion de l'IL-5, quant à elle, n'est obtenue qu'en présence de lymphocytes T_{H2} . L'orientation phénotypique est influencée par le type de cytokine libéré par les APCs et plus particulièrement par les DCs. Dans notre cas, la présence de l'IL-12 générée par les DCs matures favorise le développement d'un phénotype T_{H1} . L'ensemble de ces résultats a aussi été observé, de manière pratiquement identique, avec l'édifice complexe mannosylé R7Man3OVA2. Ainsi, avec la dose utilisée pour immuniser les souris (à savoir 11,7 nmol), nous n'avons pas observé de bénéfice de la glycosylation sur l'immunogénicité T. Il semblerait qu'il n'y ait pas de ciblage différentiel entre le candidat vaccin et l'édifice mannosylé. En résumé, nous avons malgré tout, obtenu une importante activation des lymphocytes T $CD4^+$ OT2 par le peptide OVA 323-339 intégré dans l'édifice candidat vaccin complexe, avec mise en évidence d'une orientation phénotypique de type T_{H1} .

C. Tests d'immunogénicité B

Lors de ces tests, nous avons analysé la quantité et la nature des anticorps induits *in vivo* par le candidat vaccin R7GalNAc3OVA2 ainsi que par d'autres composés tels que R7Man3OVA2, R7GalNAc, R7Linker et OVA323-339. A partir de ces molécules, deux immunisations successives des souris C57BL/6 par voie intra-dermique (Figure 5.13), ont été effectuées lors des jours 1 (J0) et 21 (J+20) à raison de 11,7 nmol par souris, suivies de deux saignées aux jours 20 (J+19) et 28 (J+27). Le dosage et la détection des anticorps ont été réalisés par la technique ELISA.

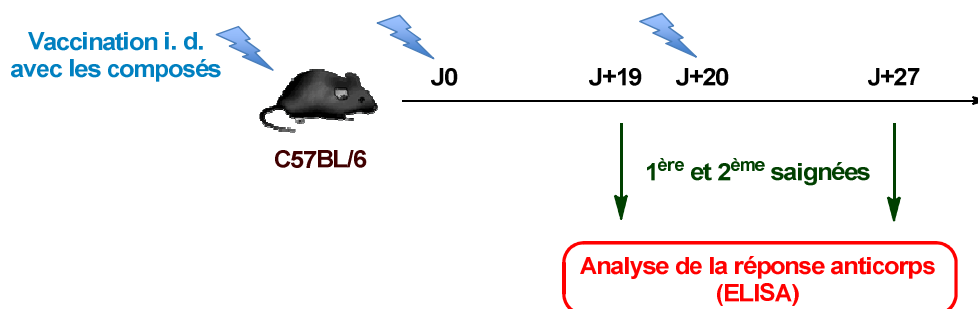


Figure 5.13: Méthode utilisée *in vivo* pour analyser la réponse anticorps.

Pour l'analyse des anticorps générés, le composé R7GalNAc3 et le peptide OVA 323-339 ont été immobilisés sur une microplaque (Figures 5.14a et 5.14c). De son côté, le peptide biotinylé de référence Tn3G7KG-b (présentant trois antigènes Tn - Figure 5.14b) a été

immobilisé sur une plaque pré-coatée par de la streptavidine. Après révélation, on a constaté la présence d'anticorps IgG qui reconnaissent seulement notre mime synthétique du cluster trimérique Tn. Ainsi, nous n'avons pas identifié d'anticorps fixant spécifiquement le peptide OVA 323-339 ou le cluster Tn du peptide de référence.

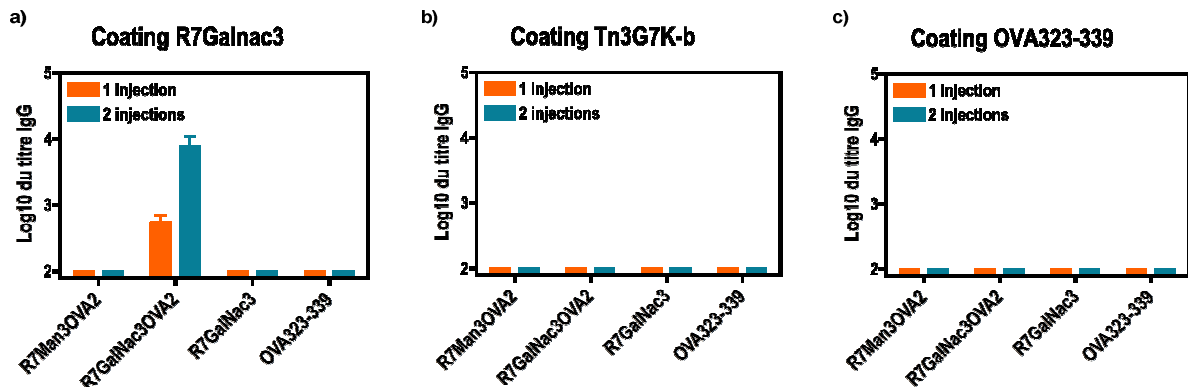


Figure 5.14: Dosage et détection du type d'anticorps généré *in vivo*.

Par la suite, une mesure de la reconnaissance des cellules humaines cancéreuses Jurkat (Tn^+) par les IgG induits (issus de la deuxième saignée), a été expérimentée (Figure 5.15). Malheureusement, ces IgG ne fixent pas les formes natives du cluster Tn exprimées par ces cellules cancéreuses. Des études plus poussées, semblent également indiquer une réponse humorale dirigée contre notre composante adjuvante R7.

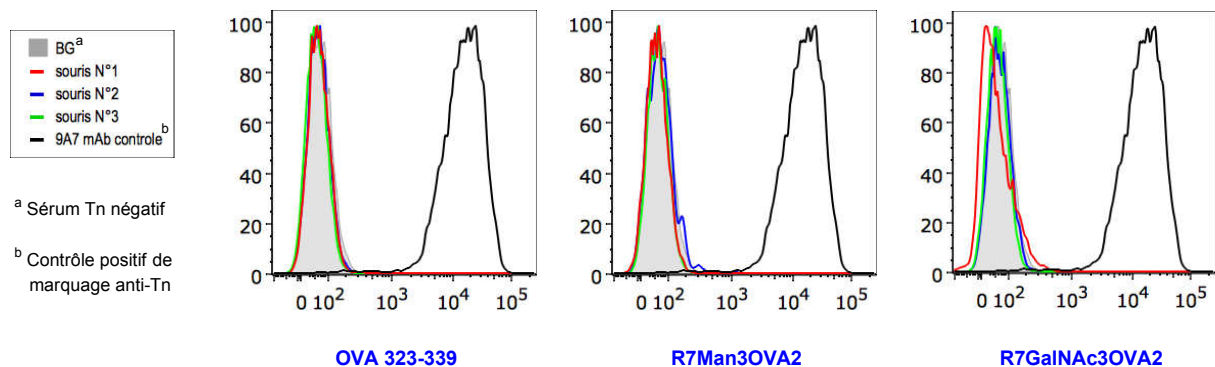


Figure 5.15: Analyse de la reconnaissance des cellules cancéreuses Jurkat (Tn^+).

Conclusion sur ces tests immunologiques in vivo

L'ensemble de ces résultats, nous permettent d'affirmer que nous sommes parvenus à construire un édifice candidat vaccin complexe à trois composantes qui stimulent les effecteurs cibles du système immunitaire que sont les DCs, les cellules T_H et les cellules B. Ceci a permis l'établissement d'une réponse humorale conduisant à l'obtention finale d'anticorps IgG. Néanmoins, dû à un mimétisme imparfait des structures Tn au niveau du candidat vaccin, les IgG induits ne sont pas spécifiques du cluster trimérique Tn naturel présent à la surface des cellules tumorales. Certaines équipes et notamment celle du Pr. Claude Leclerc ont mis en exergue l'influence que pouvait avoir la structure aglycone dans la fixation des anticorps anti-Tn et donc dans la production d'une réponse immunitaire adéquate. Dans notre cas, il est possible d'envisager que la plateforme β -tripeptotide, de part son importante flexibilité, défavorise la reconnaissance anticorps anti-Tn. Afin d'acquérir une réponse humorale plus appropriée, certaines modifications structurales au niveau de notre mime synthétique mais aussi au niveau de l'immuno-adjuvant doivent être apportées.

Conclusions et perspectives

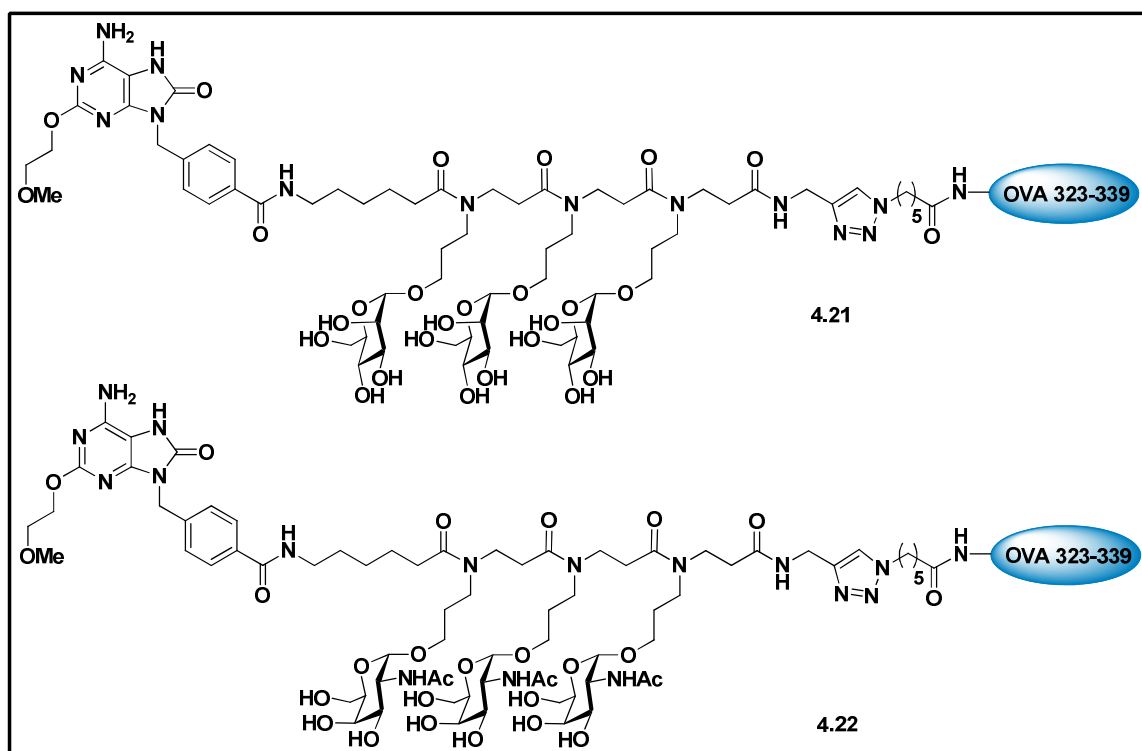
L'objectif de cette thèse était de développer un candidat vaccin à trois composantes qui puisse être employé dans le cadre d'une approche en immunothérapie antitumorale. D'un point de vu stratégique, ces composantes devaient être synthétisées individuellement puis liées ensemble suivant un ordre précis. Des constructions mannosylées ont été établies. Celles-ci nous ont permis de mettre en place des conditions réactionnelles spécifiques mais elles nous ont également servi de référence pour les tests immunologiques.

Pour commencer, nous avons élaboré des structures glycopeptoides à l'aide de trois méthodes de synthèse en solution. Dans le cas des plateformes β -tripeptoides *O*-glycosylées, nous avons développé des monomères amines mannose et GalNAc grâce auxquels nous avons pu opposer la méthode submonomère et la méthode monomère. Nous avons alors constaté que l'approche submonomère était inadaptée à l'obtention des produits escomptés. En parallèle, grâce à une étude approfondie de la méthode monomère, nous sommes parvenus à établir des conditions de couplage peptidique optimales. Lors de cette étude, nous avons également remarqué que l'élimination du groupement carboxybenzyle de nos plateformes n'était pas aussi aisée que nous l'avions espéré.

Pour accéder aux plateformes β -tripeptoides *S*-glycosylées, nous avons utilisé le couplage thiol-ène par voie photochimique. Nous avons montré que cette méthode était particulièrement intéressante pour greffer rapidement et de manière multivalente des thiosucres sur les plateformes peptoides. Nous avons notamment observé que la conversion des alcènes était influencée par la nature du groupement protecteur de nos plateformes.

Une fois ces glycoclusters en notre possession, nous avons été en mesure de pouvoir les conjuguer à un puissant agoniste du TLR7 (**3.7**), par l'intermédiaire de l'acide amino-caproïque. Deux conditions efficaces de couplage peptidique ont été mises au point pour lier, dans un premier temps, l'agoniste avec l'espaceur et ensuite pour lier le composé résultant à nos glycoclusters. Néanmoins, faute de temps, cette dernière étape n'a pu être réalisée avec la plateforme *S*-GalNAc **2.59**. Nous n'avons donc pas pu poursuivre notre étude avec les édifices *S*-glycosylés.

Par la suite, nous avons démontré que la réaction de CuAAC était une méthode pertinente pour conjuguer en solution le peptide OVA 323-339 aux édifices *O*-glycosylés. Dans ce cadre, nous avons réussi à mettre au point des conditions de réaction et de purification optimales. L'édifice complexe *O*-mannosylé **4.21** et le candidat vaccin **4.22** associant ensemble les trois composantes choisies, ont alors été synthétisés avec succès.



Des tests immunologiques *in vitro* et *in vivo* ont au final été effectués. Ces tests ont démontré que la candidat vaccin induisait une forte activation du système immunitaire inné et adaptatif, conduisant à une réponse humorale caractérisée par la production d'anticorps IgG. A ce stade, le candidat vaccin répondait favorablement à nos attentes. Cependant, ces anticorps n'étaient pas orientés vers la cible escomptée. En effet, ils ne reconnaissaient pas la forme Tn naturelle. Dans la continuité de ce projet et pour résoudre ces problèmes, nous devrons à priori changer la partie glycopeptoïde par un meilleur mime du cluster trimérique Tn. La séquence Ser-Thr-Thr, dont chaque résidu est glycosylé par du GalNAc et qui a été utilisée au sein du candidat vaccin MAG:Tn3-PV mis au point à l'Institut Pasteur, pourrait être envisagée. Nous nous rapprocherons alors des structures natives exprimées par les cellules tumorales. D'autre part de nombreux agonistes synthétiques du TLR7 ont été développés dans la littérature. Pour rester dans l'état d'esprit d'un agoniste dérivé de l'adénine, nous pourrions utiliser un des composés phare de cette famille qui est le SM360320. En outre, avant de l'incorporer dans une structure vaccinale, il sera nécessaire de vérifier, au préalable, si celui-ci n'induit pas de réponse anticorps dirigée contre lui.

Partie expérimentale

I. Synthèses organiques

A. Méthodes générales

1. Solvants, réactifs et chromatographies

Les **solvants et réactifs anhydres** sont obtenus par distillation en milieu inerte comme suit:

- DCM: distillé sur CaH_2 sous argon.
- MeOH: distillé sur MgI_2 sous argon.
- THF: distillé en présence de sodium et de benzophénone, sous argon.
- CH_3CN : issu d'une bouteille qualité «HPLC» puis stocké sur tamis moléculaire 4 Å et sous argon.
- Et_3N , allylamine: distillés sur KOH puis stockés sur tamis moléculaire 3 Å et sous argon.
- Toluène: séché sur fils de sodium.
- CHCl_3 et AcOEt: distillés, séchés puis stockés sur tamis moléculaire 4 Å et sous argon.
- DMF: issu d'une bouteille qualité «peptide synthesis/amine free» puis stocké sur tamis moléculaire 4 Å et sous argon.

Les **chromatographies sur couche mince (CCM)** ont été réalisées sur des plaques de silice KIELSELGEL 60 F₂₅₄ (MERCK) en aluminium. L'éluant utilisé est précisé dans chaque cas. La révélation des plaques est, dans un premier temps, effectuée par fluorescence UV à 254 nm, puis complétée ou pas par l'utilisation de révélateurs chimiques:

- Acide phosphomolybdique et ninhydrine pour les plateformes β -peptoides.
- Acide sulfurique 30% dans le MeOH, vanilline, acide phosphomolybdique et ninhydrine pour les composés glycosylés (conjugués ou pas avec l'agoniste du récepteur TLR7).

NB: Les hétérocycles aromatiques ne sont révélés que par fluorescence UV à 254 nm.

Les **purifications par chromatographie sur gel de silice** sont effectuées avec de la silice flash (40-63 μm MERCK) et de faibles pressions d'air (environ 200 mbars). L'éluant utilisé est précisé dans chaque cas.

Les **spectres HPLC analytique** ont été réalisés sur un appareil DIONEX (four TCC-100 à 30°C, pompe P580, injecteur ASI-100) couplé à un détecteur UVD340U. La majorité des expériences ont été effectuées en phase inverse avec une colonne Uptisphere (C18, 5 μm , 120 Å, 4,6×250 mm). Par ailleurs, les expériences permettant de faire un suivi réactionnel de la ligation par CuAAC, entre le peptide OVA 323-339 et les édifices **4.18** et **4.19**, ont aussi été réalisées en phase inverse mais avec une colonne Uptisphere strategy (C18, 5 μm , 100 Å, 4,6×250 mm). La purification par **HPLC préparative** a été effectuée en phase inverse (C18, 5 μm , 120 Å, 250×41,4 mm) sur un appareil VARIAN (pompe Prestar 218), couplé à un détecteur à barrettes diodes VARIAN ProStar 355RI. Le facteur de scale up utilisé est de 81.

2. Analyses

Les **points de fusion (PF)** ont été mesurés sur un appareil microscope Reichert et n'ont pas été corrigés

Les **pouvoirs rotatoires** $[\alpha]_D^T$ ont été mesurés sur un polarimètre JASCO DIP-370, à longueur d'onde de 589 nm (raie D du sodium), dans une cuve de 10 cm, à une température **T** (°C), en utilisant des concentrations (*c*) en g/100 mL.

Les **spectres infrarouges (IR)** ont été réalisés sur un appareil SHIMADZU FITR-8400S équipé d'un module ATR type Pike Technologies MIRacle™. Les nombres d'onde (ν) sont exprimés en cm^{-1} . Les spectres ont été enregistrés avec 16 scans, entre 4000 et 400 cm^{-1} .

Les **spectres de masse** sont réalisés en mode electrospray positif (**ESI⁺**) sur un spectromètre Qtof-micro WATERS en utilisant une calibration interne (H_3PO_4^+). Les conditions de l'appareil sont définies ainsi:

- Tension du capillaire égale à 3000V.
- Tension du « sample cone » est égale à 35V.
- Température de la source égale à 100°C
- Température de désolvatation égale à 180°C.
- Débit du gaz pour désolvater est de 250 L/h.

Les spectres de masse haute résolution (**ESI-HR-MS**) sont effectués avec une calibration externe (tyrosyl-tyrosyl-tyrosine $m/z = 508,2084$) pour les échantillons de bas poids moléculaires et avec d'autres composés polychargés pour les échantillons de haut poids moléculaires.

Les analyses par **MALDI-TOF** ont été réalisées sur un spectromètre de masse (Voyager DE-Pro, AB Sciex) en mode réflectron positif. Les échantillons ont été dilués dans un mélange acétonitrile-eau (50-50) contenant 0.1% acide trifluoroacétique puis co-cristallisés avec la matrice (cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) sur la cible. La calibration a été effectuée avec des peptides en mélange (cal mix 2, Applied Biosystems).

Les **spectres de Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN)** ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER AVANCE 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz). Les spectres ^{13}C sont en général réalisés avec une séquence Jmod. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm), en prenant pour référence le signal résiduel du solvant deutéré utilisé, qui est précisé dans chaque cas. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz). Les abréviations employées pour décrire la multiplicité des signaux sont les suivantes:

s: singulet	t: triplet
se: singulet élargi	td: triplet dédoublé
d: doublet	q: quadruplet
dd: doublet de doublet	qu: quintuplet
ddd: doublet de doublet de doublet	m: multiplet et massif

L'attribution des spectres ^1H et ^{13}C a été effectuée à partir d'expériences à deux dimensions (COSY, HSQC...).

Par ailleurs, pour de nombreux spectres RMN ^{13}C attribués aux composés peptoides, il existe plus de valeurs que de carbones. Ceci résulte d'un mélange de conformères *cis/trans*.

B. Procédures générales

1. Déprotection d'amine protégée par un groupement Boc

L'amine protégée (1,00 mmol) est diluée dans 5,20 mL d'un mélange TFA/DCM (1:1), à 0°C sous argon. Le milieu réactionnel est ensuite placé à température ambiante pendant 30 min puis concentré sous vide. L'excès de TFA est éliminé par solubilisation du résidu dans un

minimum de 20 mL de DCM puis par évaporation sous vide. L'opération est répétée plusieurs fois. L'amine obtenue sous forme de trifluoroacétate d'ammonium est utilisée sans purification.

2. Déprotection d'acide sous forme d'ester de *tert*-butyle (CO₂*t*Bu)

L'ester de *tert*-butyle (1,00 mmol) est dilué dans 14 mL d'un mélange TFA/DCM (1:1), à 0°C sous argon. Le milieu réactionnel est ensuite placé à température ambiante pendant un temps donné (voir chaque cas particulier) puis concentré sous vide. L'excès de TFA est éliminé par solubilisation du résidu dans un minimum de 20 mL de DCM puis par évaporation sous vide. L'opération est répétée plusieurs fois. L'acide carboxylique obtenu est utilisé sans purification.

3. Protection d'une amine par un groupement Fmoc

Un milieu hétérogène contenant l'amine (1,00 mmol), une solution d'NaHCO₃ saturée (5,50 mL) et du 1,4-dioxane (2,30 mL) est placé à 0°C sous argon. A ceci est ajouté un mélange contenant le Fmoc-Cl (2,00 mmol) dilué dans du 1,4-dioxane (1,30 mL). L'ensemble est agité à température ambiante pendant 4h, puis dilué avec de l'AcOEt (40 mL). Le milieu est lavé avec de l'eau distillée (3×10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice.

4. Déprotection d'amine protégée par un groupement Fmoc

L'amine (1,00 mmol) est traitée par 38 mL d'un mélange CH₃CN/Et₂NH (2:1) à 0°C sous argon pendant 30 min puis à température ambiante pendant 4 h. Le milieu est concentré sous vide. L'excès de Et₂NH est éliminé par solubilisation du résidu dans un minimum de 50 mL de DCM puis par évaporation sous vide. L'opération est répétée plusieurs fois. L'amine obtenue est purifiée par chromatographie flash sur gel de silice.

5. Couplage peptidique utilisant HATU et DIPEA

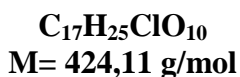
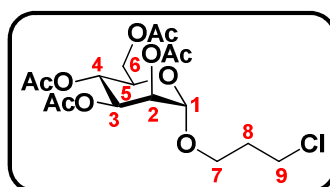
Une première solution contenant l'acide carboxylique (1,00 mmol), dilué dans un mélange anhydre DMF/DCM (1:1), est placée sous argon à température ambiante. De la DIPEA est ajoutée (2,50 mmol) et le milieu est mis sous agitation pendant 10 min. HATU (2,00 mmol) est ensuite introduit dans le mélange et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 10 min.

Une seconde solution contenant l'amine (1,00 mmol) dissoute dans du DCM est placée sous argon à température ambiante. Le contenu de ce ballon est ajouté au premier à l'aide d'une canule et l'ensemble est mis sous agitation pendant un temps donné (voir chaque cas particulier).

Après concentration du milieu, le résidu obtenu est dissout dans DCM puis lavé avec successivement: une solution d'acide citrique 5%, de l'eau distillée (2×), une solution saturée en NaHCO₃ (2×), de l'eau distillée (2×) et enfin une solution saturée en NaCl (2×). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice.

C. Procédures expérimentales du chapitre II

3'-chloropropyl-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-mannopyranoside **2.15**



A un mélange composé du mannose peracétylé **2.14** (1 éq, 10,3 mmol, 4,02 g) et du 3-chloropropanol (1,1 éq, 11,3 mmol, 0,96 mL) dilués dans le DCM (50 mL) sous argon à température ambiante est ajouté goutte à goutte BF₃.OEt₂ (3,86 éq, 39,8 mmol, 5,00 mL). Après 17h, le milieu réactionnel est dilué avec du DCM (50 mL), lavé avec une solution saturée en NaHCO₃ (2×50 mL) puis avec de l'eau distillée (2×50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Cyclohexane/AcOEt 60:40). Le composé chloré **2.15** est obtenu sous forme d'une huile jaune clair (5,32 mmol, 2,26 g) avec un rendement de 52%.

CCM: $R_f = 0,57$ (AcOEt/Cyclohexane 40:60).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 1746 (ν C=O acétates) ; 1439 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1221 ; 1136 ; 1084 ; 1046 (ν C-O) ; 780 (ν C-Cl).

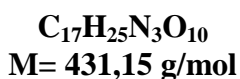
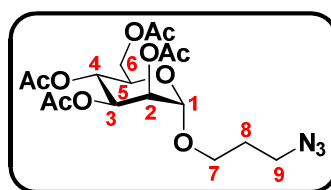
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,00 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,03 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,04 (2H, m, 2H_8) ; 2,09 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,14 (3H, s, CH_3 acétate) ; 3,57 (1H, m, H_7) ; 3,66 (2H, m, 2H_9) ; 3,90 (1H, m, H_7) ; 3,98 (1H, m, H_5) ; 4,11 (1H, dd, $J_{\text{H6 ou H6}'\text{-H5}} = 2,4$ Hz et $J_{\text{H6-H6}'} = 12,2$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,26 (1H, dd, $J_{\text{H6 ou H6}'\text{-H5}} = 5,3$ Hz et $J_{\text{H6-H6}'} = 12,2$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,81 (1H, d, $J_{\text{H1-H2}} = 1,6$ Hz, H_1) ; 5,26 (3H, m, $\text{H}_2, \text{H}_3, \text{H}_4$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,7 ; 20,7 ; 20,8 ($4 \times \text{CH}_3$ acétates) ; 31,9 (C_8) ; 41,4 (C_9) ; 62,4 (C_6) ; 64,4 (C_7) ; 66,0 ; 68,6 ; 69,0 ; 69,4 ($\text{C}_2, \text{C}_3, \text{C}_4, \text{C}_5$) ; 97,6 (C_1) ; 169,7 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,6 ($4 \times \text{C=O}$ acétates).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 447,1034$; trouvé 447,1036 (0,04 ppm).

$[\alpha]$ = +41 ($T = 25^\circ\text{C}$; $c = 0,50$; CHCl_3).

3'-azidopropyl-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-mannopyranoside **2.16**



Dans du DMF (17 mL) sont introduits le composé chloré **2.15** (1 éq, 1,34 mmol, 570 mg), le NaN_3 (10 éq, 13,4 mmol, 873 mg) puis le NaI (1 éq, 1,34 mmol, 201 mg). Le milieu est chauffé à 60°C pendant 4h. Après concentration et dilution avec du DCM (100 mL), le mélange est lavé avec de l'eau distillée (3×50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée, concentrée et le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Cyclohexane/ AcOEt 60:40). Le composé **2.16** est obtenu sous forme d'une huile incolore (1,31 mmol, 565 mg) avec un rendement de 98%.

CCM: $R_f = 0,42$ (AcOEt/Cyclohexane 40:60).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2100 ($\nu \text{ N}\equiv\text{N}$) ; 1747 ($\nu \text{ C=O}$ acétates) ; 1437 ; 1432 ; 1370 ($\delta \text{ C-H}$ alkyles) ; 1221 ; 1137 ; 1083 ; 1046 ($\nu \text{ C-O}$, $\nu \text{ C-N}$).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,88 (2H, m, 2H_8) ; 1,98 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,03 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,09 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,14 (3H, s, CH_3 acétate) ; 3,41 (2H, t, $J_{\text{H9-H8}} = 6,5$

Hz, 2H₉) ; 3,51 (1H, m, H₇) ; 3,8 (1H, m, H₇) ; 3,94 (1H, ddd, J_{H5-H6} ou $H6'$ = 2,5 Hz, J_{H5-H6} ou $H6'$ = 5,4 Hz et J_{H5-H4} = 8,1 Hz, H₅) ; 4,10 (1H, dd, J_{H6} ou $H6'-H5$ = 2,5 Hz et $J_{H6-H6'}$ = 12,3 Hz, H₆ ou H_{6'}) ; 4,26 (1H, dd, J_{H6} ou $H6'-H5$ = 5,4 Hz et $J_{H6-H6'}$ = 12,3 Hz, H₆ ou H_{6'}) ; 4,80 (1H, d, J_{H1-H2} = 1,6 Hz, H₁) ; 5,27 (3H, m, H₂, H₃, H₄).

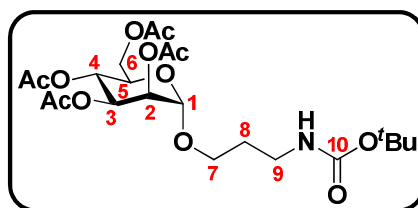
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,6 ; 20,8 (4×CH₃ acétates) ; 28,6 (C₈) ; 48,0 (C₉) ; 62,4 (C₆) ; 64,8 (C₇) ; 66,1 ; 68,6 ; 69,0 ; 69,4 (C₂, C₃, C₄, C₅) ; 97,6 (C₁) ; 169,7 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,6 (4×C=O acétates).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 454,1438 ; trouvé 454,1436 (0,4 ppm).

[α]_D = +55 (T = 25°C ; c = 0,50 ; CHCl₃).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²⁰⁰

Composé O-mannosylé 2.18



C₂₂H₃₅NO₁₂
M = 505,22 g/mol

Dans un autoclave à hydrogénation est introduite une solution contenant le composé **2.16** (1 éq, 2,32 mmol, 1,00 g) dans de l'AcOEt (54 mL). A cette solution sont ajoutés du (Boc)₂-O (1,5 éq, 3,50 mmol, 761 mg), Pd/C (20% par rapport à la quantité en composé **2.16**, soit 200 mg) puis de la triéthylamine (2 éq, 4,65 mmol, 0,65 mL). Le milieu réactionnel est placé à température ambiante sous 4 bars de dihydrogène pendant 4h. Après filtration sur célite et concentration du milieu, le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane 50:50). Le composé **2.18** est obtenu sous forme d'une huile incolore (2,11 mmol, 1,07 g) avec un rendement de 91%.

CCM: R_f = 0,20 (AcOEt/Cyclohexane 40:60).

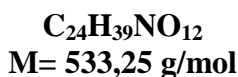
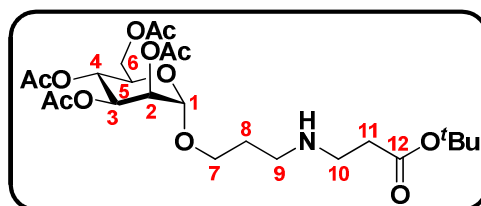
IR (ATR) ν (cm⁻¹): 1748 ; 1714 (ν C=O acétates et carbamate) ; 1515 ; 1450 ; 1368 (δ C-H alkyles) ; 1221 ; 1168 ; 1136 ; 1082 ; 1047 (ν C-O, ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$ du groupement *tert*-butyle) ; 1,8 (2H, m, 2H_8) ; 1,98 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,03 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,10 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,14 (3H, s, CH_3 acétate) ; 3,21 (2H, m, 2H_9) ; 3,50 (1H, m, H_7) ; 3,75 (1H, m, H_7) ; 3,98 (1H, m, H_5) ; 4,08 (1H, dd, $J_{\text{H6 ou H6}'\text{-H5}} = 2,3$ Hz et $J_{\text{H6-H6}'} = 12,3$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,27 (1H, dd, $J_{\text{H6 ou H6}'\text{-H5}} = 5,4$ Hz et $J_{\text{H6-H6}'} = 12,3$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,67 (1H, s, NH) ; 4,78 (1H, d, $J_{\text{H1-H2}} = 1,6$ Hz, H_1) ; 5,27 (3H, m, H_2 , H_3 , H_4).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,5 ; 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ($4\times\text{CH}_3$ acétates) ; 28,3 ($3\times\text{CH}_3$ du *tert*-butyle) ; 29,7 (C_8) ; 37,7 (C_9) ; 62,4 (C_6) ; 66,0 (C_7) ; 66,1 ; 66,5 ; 69,0 ; 69,5 (C_2 , C_3 , C_4 , C_5) ; 79,3 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,6 (C_1) ; 155,9 (C_{10}) ; 169,7 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,6 ($4\times\text{C}=\text{O}$ acétates, C_{10}).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 528,2057$; trouvé 528,2036 (4 ppm).

Monomère amine Mannose 2.12



La synthèse du monomère *O*-Mannose **2.12** se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, la procédure générale de déprotection d'amine protégée par un Boc est appliquée en utilisant:

- Le composé **2.18** (1 éq, 2,31 mmol, 1,169 g)
- Du TFA (6 mL)
- Du DCM (6 mL)

Le sel de trifluoroacétate d'ammonium **2.19** est obtenu sous forme d'une huile marron clair (quantitatif).

Dans un deuxième temps, l'ammonium formé ci-dessus (1 éq, 2,31 mmol) est dilué dans CH_3CN anhydre (23 mL permettant d'avoir une concentration en ammonium de 0,1 M) sous argon. A cette solution, sont ajoutés l'acrylate de *tert*-butyle (3 éq, 6,94 mmol, 1,02 mL) et la

triéthylamine (2 éq, 4,63 mmol, 0,64 mL). Le milieu réactionnel est placé sous argon à 50°C pendant 24h. Après concentration du milieu, le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 90:10). Le monomère **2.12** est obtenu sous forme d'une huile orangée (1,62 mmol, 862 mg) avec un rendement de 70%.

CCM: $R_f = 0,45$ (DCM/MeOH 90:10).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 1748 ; 1675 (ν C=O esters) ; 1457 ; 1430 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1159 ; 1136 ; 1085 ; 1048 (ν C-O, ν C-N).

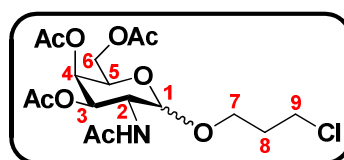
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,44 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,84 (2H, quintuplet, $J_{\text{H}8-\text{H}7/\text{H}9} = 7,0$ Hz, 2H_8) ; 1,98 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,04 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,10 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,15 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,25 (1H, s, NH) ; 2,49 (2H, t, $J_{\text{H}11-\text{H}10} = 6,5$ Hz, 2H_{11}) ; 2,76 (2H, t, $J_{\text{H}9-\text{H}8} = 7,0$ Hz, 2H_9) ; 2,88 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, 2H_{10}) ; 3,53 (1H, m, H_7) ; 3,78 (1H, m, H_7) ; 4,00 (1H, ddd, $J_{\text{H}5-\text{H}6}$ ou $\text{H}6' = 2,4$ Hz, $J_{\text{H}5-\text{H}6}$ ou $\text{H}6' = 5,2$ Hz et $J_{\text{H}5-\text{H}4} = 7,6$ Hz, H_5) ; 4,10 (1H, dd, $J_{\text{H}6}$ ou $\text{H}6'-\text{H}5 = 2,4$ Hz et $J_{\text{H}6-\text{H}6'} = 12,3$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,29 (1H, dd, $J_{\text{H}6}$ ou $\text{H}6'-\text{H}5 = 5,2$ Hz et $J_{\text{H}6-\text{H}6'} = 12,3$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,82 (1H, d, $J_{\text{H}1-\text{H}2} = 1,6$ Hz, H_1) ; 5,28 (3H, m, H_2 , H_3 , H_4).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,7 ; 20,7 ; 20,8 ($4\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,5 (C_8) ; 28,0 ($3\times\text{CH}_3$ ester *tert*-butyle) ; 33,0 (C_{11}) ; 44,3 (C_{10}) ; 46,1 (C_9) ; 62,4 (C_6) ; 65,6 (C_7) ; 66,0 ; 68,5 ; 69,0 ; 69,3 (C_2 , C_3 , C_4 , C_5) ; 81,6 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,5 (C_1) ; 169,7 ; 169,8 ; 170,0 ; 170,7 ; 171,4 ($4\times\text{C}=\text{O}$ acétates, C_{12}).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 534,2551$; trouvé 534,254 (2,1 ppm).

$[\alpha] = +29$ (T= 25°C ; c= 0,50 ; CHCl_3).

3'-chloropropyl-2-acétamido-2-déoxy-3,4,6-tri-O-acétyl- α/β -D-galactopyranoside **2.20**



$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{ClN}_9$
423,13 g/mol

Une solution contenant le D-GalNAc (1 éq, 4,50 mmol, 1,00 g) et le 3-chloropropanol (15 mL) est placée à 0°C sous argon. A ce mélange est ajouté goutte à goutte du chlorure d'acétyle (1,2 éq, 5,40 mmol, 0,38 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 70°C pendant 6h. Après

refroidissement, du Ac_2O (4 mL) et de la pyridine (8 mL) sont introduits. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 3h. Au final, après concentration et purification par chromatographie sur gel de silice, le mélange d'anomères chlorés (80:20, α : β) **2.20** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (2,80 mmol, 1,18 g) avec un rendement de 62%.

CCM: $R_f = 0,48$ (AcOEt).

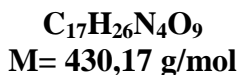
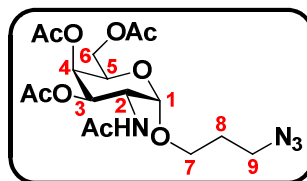
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3300 (ν N-H) ; 1746 (ν C=O acétates) ; 1662 (ν C=O acétamide) ; 1544 ; 1533 (δ N-H) ; 1434 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1229 ; 1161 ; 1131 ; 1077 ; 1045 (ν C-O, ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): *anomère α* : 1,95-2,15 (14H, m, $2\text{H}_{8\alpha}$, CH_3 acétamide, $3\times\text{CH}_3$ acétates) ; 3,68-6,78 (1H, m, $\text{H}_{7\alpha}$) ; 3,80 (2H, t, $J_{\text{H}9\alpha-\text{H}8} = 6,1$ Hz, $2\text{H}_{9\alpha}$) ; 3,85-3,93 (1H, m, $\text{H}_{7\alpha}$) ; 4,03-4,26 (3H, m, $\text{H}_{5\alpha}$, $2\text{H}_{6\alpha}$) ; 4,57 (1H, m, $\text{H}_{2\alpha}$) ; 4,89 (1H, d, $J_{\text{H}1\alpha-\text{H}2\alpha} = 3,6$ Hz, $\text{H}_{1\alpha}$) ; 5,13 (1H, dd, $J_{\text{H}3\alpha-\text{H}4\alpha} = 3,2$ Hz et $J_{\text{H}3\alpha-\text{H}2\alpha} = 11,4$ Hz, $\text{H}_{3\alpha}$) ; 5,36 (1H, m, $\text{H}_{4\alpha}$) ; 5,63 (1H, d, $J_{\text{NH}-\text{H}2\alpha} = 9,8$ Hz, NHAc) - *anomère β* : 1,95-2,15 (14H, m, $2\text{H}_{8\beta}$, CH_3 acétamide, $3\times\text{CH}_3$ acétates) ; 3,51-3,61 (3H, m, $\text{H}_{7\beta}$, $2\text{H}_{9\beta}$) ; 3,80 (1H, m, $\text{H}_{7\beta}$) ; 4,03-4,26 (3H, m, $\text{H}_{5\beta}$, $2\text{H}_{6\beta}$) ; 4,33 (1H, m, $\text{H}_{2\beta}$) ; 5,00 (1H, m, $\text{H}_{1\beta}$) ; 5,18 (1H, m, $\text{H}_{3\beta}$) ; 5,30 (1H, m, $\text{H}_{4\beta}$) ; 6,04 (1H, d, $J_{\text{NH}-\text{H}2\beta} = 8,2$ Hz, NHAc).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): *anomère α* : 20,8 ; 20,9 ; 21,0 ($3\times\text{CH}_3$ acétates) ; 23,5 (CH_3 acétamide) ; 32,0 ($\text{C}_{8\alpha}$) ; 41,7 ($\text{C}_{9\alpha}$) ; 48,0 ($\text{C}_{2\alpha}$) ; 62,2 ($\text{C}_{6\alpha}$) ; 65,1 ($\text{C}_{7\alpha}$) ; 67,1 ; 67,5 ; 68,5 ($\text{C}_{3\alpha}$, $\text{C}_{4\alpha}$, $\text{C}_{5\alpha}$) ; 98,0 ($\text{C}_{1\alpha}$) ; 170,2 ; 170,5 ; 170,6 ; 171,2 ($4\times\text{C}=\text{O}$ acétates et acétamide) - *anomère β* : 20,8 ; 20,9 ; 21,0 ($3\times\text{CH}_3$ acétates) ; 23,4 (CH_3 acétamide) ; 32,3 ($\text{C}_{8\beta}$) ; 41,8 ($\text{C}_{9\beta}$) ; 51,4 ($\text{C}_{2\beta}$) ; 62,4 ($\text{C}_{6\beta}$) ; 65,7 ($\text{C}_{7\beta}$) ; 71,0 ; 71,6 ; 73,0 ($\text{C}_{3\beta}$, $\text{C}_{4\beta}$, $\text{C}_{5\beta}$) ; 106,6 ($\text{C}_{1\beta}$) ; 170,2 ; 170,5 ; 170,6 ; 171,2 ($4\times\text{C}=\text{O}$ acétates et acétamide).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 423,1369$; trouvé 423,1371 (0,5 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 446,1188$; trouvé 446,1205 (3,9 ppm).

$[\alpha]$ = +24 ($T = 25^\circ\text{C}$; $c = 0,50$; CHCl_3).

3'-azidopropyl-2-acétamido-2-déoxy-3,4,6-tri-O-acétyl- α -D-galactopyranoside 2.21

Dans du DMF (35 mL) sont introduits le composé chloré **2.20** (1 éq, 2,73 mmol, 1,15 g), le NaN_3 (10 éq, 27,3 mmol, 1,77 g) puis le NaI (1 éq, 2,73 mmol, 409 mg). Le milieu est chauffé à 60°C pendant 4h. Après concentration et dilution avec du DCM (200 mL), le mélange est lavé avec de l'eau distillée (4×100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée, concentrée et le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 98:2). Le composé **2.21** est obtenu sous forme d'une huile jaune (1,93 mmol, 830 mg) avec un rendement de 71%.

CCM: $R_f = 0,34$ (DCM/MeOH 98:2).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3300 (ν N-H) ; 2099 (ν $\text{N}\equiv\text{N}$) ; 1746 (ν C=O acétates) ; 1661 (ν C=O acétamide) ; 1539 ; 1533 (δ N-H) ; 1436 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1225 ; 1165 ; 1132 ; 1083 ; 1046 (ν C-O, ν C-N).

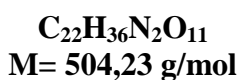
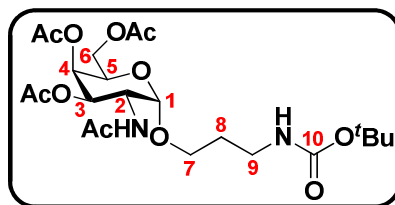
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,91 (2H, quintuplet, $J_{\text{H8-H7H9}} = 6,1$ Hz, 2H_8) ; 1,96 (3H, s, CH_3 acétamide) ; 2,00 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,05 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,16 (3H, s, CH_3 acétate) ; 3,40 (2H, m, 2H_9) ; 3,53 (1H, dt, $J_{\text{H7-H8}} = 6,1$ Hz et $J_{\text{H7-H7'}} = 10,1$ Hz, H_7) ; 3,81 (1H, dt, $J_{\text{H7'-H8}} = 6,1$ Hz et $J_{\text{H7'-H7}} = 10,1$ Hz, $\text{H}_{7'}$) ; 4,05-4,16 (3H, m, H_5 , 2H_6) ; 4,58 (1H, ddd, $J_{\text{H2-H1}} = 3,6$ Hz, $J_{\text{H2-H3}} = 10,6$ Hz et $J_{\text{H2-NH}} = 11,2$ Hz, H_2) ; 4,88 (1H, d, $J_{\text{H1-H2}} = 3,6$ Hz, H_1) ; 5,15 (1H, dd, $J_{\text{H3-H4}} = 3,3$ Hz et $J_{\text{H3-H2}} = 10,6$ Hz, H_3) ; 5,37 (1H, d, $J_{\text{H4-H3}} = 3,3$ Hz, H_4) ; 5,64 (1H, d, $J_{\text{NH-H2}} = 11,6$ Hz, NHAc).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ($3\times\text{CH}_3$ acétates) ; 23,3 (CH_3 acétamide) ; 28,6 (C_8) ; 47,8 (C_2) ; 48,5 (C_9) ; 61,9 (C_6) ; 65,4 (C_7) ; 66,8 ; 67,3 ; 68,3 (C_3 , C_4 , C_5) ; 97,8 (C_1) ; 170,0 ; 170,3 ; 170,4 ; 171,0 ($4\times\text{C=O}$ acétates et acétamide).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 431,1773$; trouvé 431,1787 (3,2 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 453,1597$; trouvé 453,1597.

$[\alpha] = +32$ ($T = 25^\circ\text{C}$; $c = 0,745$; CHCl_3).

Composé *O*-GalNAc **2.22**



Dans un autoclave à hydrogénation est introduite une solution contenant l'azoture **2.21** (1 éq, 1,93 mmol, 830 mg) dans de l'AcOEt (42 mL). A cette solution sont ajoutés du $(\text{Boc})_2\text{-O}$ (1,5 éq, 2,90 mmol, 632 mg), Pd/C (24% par rapport à la quantité en composé azido, soit 200 mg) puis de la triéthylamine (2 éq, 3,86 mmol, 0,54 mL). Le milieu réactionnel est placé à température ambiante sous 4 bars de dihydrogène pendant 2h. Après filtration sur célite et concentration du milieu, le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 98:2). Le composé **2.22** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (1,60 mmol, 805 mg) avec un rendement de 83%.

CCM: $R_f = 0,24$ (DCM/MeOH 98:2).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3353 ; 3322 (ν N-H acétamide et carbamate) ; 3005 (ν $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$) ; 2931 ; 2924 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1748 ; 1707 ; 1684 (ν C=O acétates, carbamate et acétamide) ; 1559 ; 1539 (δ N-H) ; 1521 ; 1506 ; 1457 ; 1437 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1228 ; 1167 ; 1132 ; 1071 ; 1045 (ν C-O, ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$ du *tert*-butyle) ; 1,75 (2H, m, 2H_8) ; 1,98 (3H, s, CH_3 acétamide) ; 2,01 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,04 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,16 (3H, s, CH_3 acétate) ; 3,15 (1H, m, H_9) ; 3,40 (2H, m, H_7 , H_9) ; 3,75 (1H, m, H_7) ; 4,16-4,08 (3H, m, H_5 , 2H_6) ; 4,60 (2H, m, H_2 , NH carbamate) ; 4,83 (1H, d, $J_{\text{H1-H2}} = 3,0 \text{ Hz}$, H_1) ; 5,14 (1H, dd, $J_{\text{H3-H4}} = 3,2 \text{ Hz}$ et $J_{\text{H3-H2}} = 11,3 \text{ Hz}$, H_3) ; 5,37 (1H, d, $J_{\text{H4-H3}} = 3,2 \text{ Hz}$, H_4) ; 6,26 (1H, d, $J_{\text{NH-H2}} = 9,3 \text{ Hz}$, NHAc).

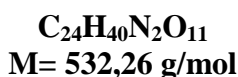
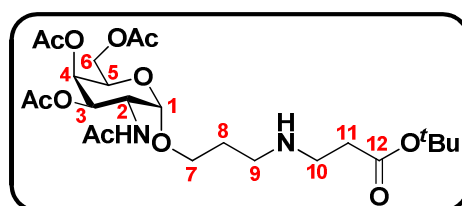
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ($3\times\text{CH}_3$ acétates) ; 23,1 (CH_3 acétamide) ; 28,3 ($3\times\text{CH}_3$ du *tert*butyle) ; 30,0 (C_8) ; 37,8 (C_9) ; 48,5 (C_2) ; 61,9 (C_6) ; 65,7 (C_7) ; 66,6 ; 67,3 ;

68,7 (C₃, C₄, C₅) ; 97,7 (C₁) ; 156,1 (C=O carbamate) ; 170,3 ; 170,4 ; 170,6 ; 170,8 (4×C=O acétates et acétamide).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 527,2217 ; trouvé 527,2193 (4,5 ppm) ; m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 505,2392 ; trouvé 505,2444 (10 ppm).

[α]_D = +38 (T = 25°C ; c = 0,50 ; CHCl₃).

Monomère amine GalNAc 2.13



La synthèse du monomère *O*-GalNAc **2.13** se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, la procédure générale de déprotection d'amine protégée par un Boc est appliquée en utilisant:

- Le composé **2.22** (1 éq, 0,70 mmol, 352 mg)
- Du TFA (1,80 mL)
- Du DCM (1,80 mL)

Le sel de trifluoroacétate d'ammonium **2.23** est obtenu sous forme d'une huile marron clair (quantitatif). Dans un deuxième temps, l'ammonium formé ci-dessus (1 éq, 0,69 mmol) est dilué dans CH₃CN anhydre (7 mL permettant d'avoir une concentration en ammonium de 0,1 M) sous argon. A cette solution, sont ajoutés l'acrylate de *tert*-butyle (3 éq, 2,1 mmol, 0,31 mL) et la Et₃N (2 éq, 1,40 mmol, 0,19 mL). Le milieu réactionnel est placé sous argon à 50°C pendant 17h. Après concentration du milieu, le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 95:5). Le monomère **2.13** est obtenu sous forme d'une mousse jaune (0,55 mmol, 291 mg) avec un rendement de 78%.

CCM: R_f = 0,60 (DCM/MeOH 90:10).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3352 (ν N-H acétamide et amine) ; 2980 ; 2970 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1748 ; 1734 ; 1674 ; 1663 (ν C=O acétates, ester de *tert*-butyle et acétamide) ; 1551, 1540 (δ N-H) ; 1517 ; 1472 ; 1457 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1225 ; 1203 ; 1180 ; 1159 ; 1133 ; 1047 (ν C-O, ν C-N).

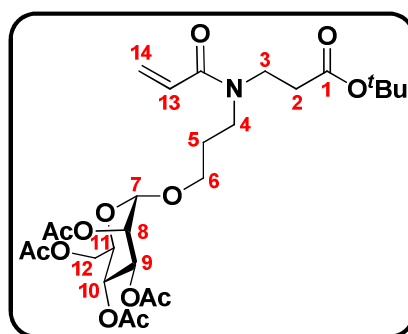
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,88-2,14 (14H, m, $3\times\text{CH}_3$ acétates, CH_3 acétamide) ; 2,53-2,74 (2H, m, 2H_{11}) ; 2,93-3,08 (3H, m, 2H_9 , H_{10}) ; 3,09-3,19 (1H, m, H_{10}) ; 3,57 (1H, ddd, $J_{\text{H}7\text{'-H}8} = 4,1$ Hz, $J_{\text{H}7\text{'-H}8} = 6,5$ Hz, $J_{\text{H}7\text{'-H}7'} = 11,0$ Hz, H_7) ; 3,88 (1H, ddd, $J_{\text{H}7\text{'-H}8} = 3,9$ Hz, $J_{\text{H}7\text{'-H}8} = 7,9$ Hz, $J_{\text{H}7\text{'-H}7'} = 11,0$ Hz, H_7) ; 4,08 (2H, m, 2H_6) ; 4,24 (1H, m, H_5) ; 4,59 (1H, ddd, $J_{\text{H}2\text{-H}1} = 3,5$ Hz, $J_{\text{H}2\text{-NH}} = 9,2$ Hz, $J_{\text{H}2\text{-H}3} = 12,0$ Hz, H_2) ; 4,88 (1H, d, $J_{\text{H}1\text{-H}2} = 3,5$ Hz, H_1) ; 5,12 (1H, dd, $J_{\text{H}3\text{-H}4} = 3,2$ Hz, $J_{\text{H}3\text{-H}2} = 12,0$ Hz, H_3) ; 5,37 (1H, dd, $J_{\text{H}4\text{-H}5} = 1,1$ Hz, $J_{\text{H}4\text{-H}3} = 3,2$ Hz, H_4) ; 6,80 (1H, d, $J_{\text{NH-H}2} = 9,2$ Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,8 ; 20,9 ; 23,2 ($3\times\text{CH}_3$ acétates, CH_3 acétamide) ; 27,8 (C_8) ; 28,2 ($3\times\text{CH}_3$ du *tert*-butyle) ; 33,0 (C_{11}) ; 45,0 ; 47,4 ; 47,7 (C_2 , C_9 , C_{10}) ; 62,1 (C_6) ; 67,0 ; 67,6 ; 67,8 ; 68,0 (C_3 , C_4 , C_5 , C_7) ; 99,0 (C_1) ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 171,0 ; 172,8 ($3\times\text{C=O}$ acétates, C=O acétamide, C_{12}).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 533,2710$; trouvé 533,2699 (2,1 ppm).

$[\alpha]_D^{25}$ = +34 (T= 25°C ; c= 0,50 ; CHCl_3).

Acrylamide O-Man 2.24



$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_{13}$
M= 587,26 g/mol

A une solution d'AcOEt anhydre (1,40 mL) contenant le monomère amine mannose **2.12** (1 éq, 0,28 mmol, 150 mg, 0.2 M) sous argon à 0°C sont ajoutés goutte à goutte la triéthylamine (2,2 éq, 0,62 mmol, 86 μL) puis le chlorure d'acryloyle (1,2 éq, 0,34 mmol, 27 μL). La réaction est laissée sous agitation pendant 1h. Après l'ajout d'AcOEt (2,80 mL), le milieu réactionnel est

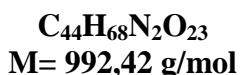
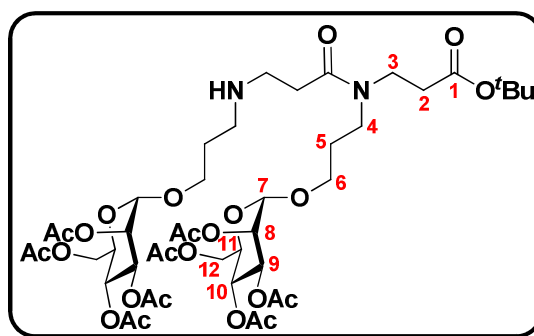
filtré, concentré (huile orangée obtenue) puis purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 98:2). Le composé **2.24** est obtenu sous forme d'une huile orangée (0,27 mmol, 158 mg) avec un rendement de 96%.

CCM: $R_f = 0,61$ (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 1748 ; 1700 (ν C=O esters et amide) ; 1653 ; 1614 (ν C=C) ; 1478 ; 1432 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1222 ; 1152 ; 1138 ; 1083 ; 1047 (ν C-O, ν C-N) ; 980 ; 835 ; 790 (δ C-H alcène).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,36 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,83 (2H, m, 2H_5) ; 1,90-2,08 (12H, m, $4\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,47 (2H, m, 2H_2) ; 3,34-3,55 (5H, m, 2H_3 , 2H_4 , H_6) ; 3,67 (1H, m, H_6) ; 3,89 (1H, m, H_{11}) ; 4,00 (1H, m, H_{12}) ; 4,20 (1H, m, H_{12}) ; 4,72 (1H, s élargit, H_7) ; 5,14-5,26 (3H, m, H_8 , H_9 , H_{10}) ; 5,65 (1H, ddd, $J_{\text{H}14-\text{H}14'} = 1,8$ Hz, $J(\text{cis})_{\text{H}14-\text{H}13} = 10,3$ Hz et $J = 23,6$ Hz, H_{14}) ; 6,27 (1H, ddd, $J_{\text{H}14'-\text{H}14} = 1,8$ Hz, $J = 10,0$ Hz et $J(\text{trans})_{\text{H}14'-\text{H}13} = 16,7$ Hz, $\text{H}_{14'}$) ; 6,54 (1H, dt, $J(\text{cis})_{\text{H}13-\text{H}14} = 10,3$ Hz et $J(\text{trans})_{\text{H}13-\text{H}14'} = 16,7$ Hz, H_{13}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,4 ; 20,5 ; 20,6 ($4\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,5 ; 27,8 ; 28,9 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, C_5) ; 33,7 ; 35,3 (C_2) ; 42,5 ; 43,5 ; 43,6 ; 45,1 (C_3 , C_4) ; 62,2 (C_{12}) ; 64,6 ; 65,8 ; 65,9 ; 66,2 ; 68,3 ; 68,5 ; 68,7 ; 68,9 ; 69,2 ; 69,3 (C_6 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11}) ; 80,5 ; 81,2 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,4 ; 97,5 (C_7) ; 127,0 ; 127,3 ; 128,3 ; 128,5 (C_{13} , C_{14}) ; 166,1 (C=O acrylamide) ; 169,4 ; 169,5 ; 169,6 ; 169,8 ; 170,0 ; 170,3 ; 170,4 ($4\times\text{C}=\text{O}$ acétates, C_1).

Plateforme β -dipeptotide *O*-Man 2.25

La synthèse de la plateforme dipeptotide *O*-Mannose **2.25** se déroule en deux étapes. Dans un premier temps la procédure générale de déprotection d'amine protégée par un Boc est appliquée en utilisant:

- Le composé **2.18** (1 éq, 0,39 mmol, 196 mg)
- Du TFA (1,00 mL)
- Du DCM (1,00 mL)

Le sel de trifluoroacétate d'ammonium **2.19** est obtenu sous forme d'une huile marron clair (quantitatif).

Ensuite, dans un premier ballon, une solution contenant l'ammonium formé ci-dessus (3 éq, 0,39 mmol) et la triéthylamine (6 éq, 0,78 mmol, 107 μL) dans 0,70 mL de CH_3CN est mise sous argon à température ambiante. Dans un deuxième ballon, une solution contenant l'acrylamide **2.24** (1 éq, 0,13 mmol, 76 mg) dans 0,50 mL de CH_3CN , est également préparée sous argon et à température ambiante. Le contenu de ce deuxième ballon est introduit dans le premier à l'aide d'une canule. La réaction est laissée sous agitation pendant 40h. Après concentration, le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (gradient DCM/MeOH 94:6 jusqu'à 90:10) afin d'obtenir le composé **2.25** sous forme d'une huile jaune pâle (0,054 mmol, 54 mg) avec un rendement de 41%.

CCM: $R_f = 0,36$ (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2954 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1747 (ν C=O esters) ; 1645 (ν C=O amide) ; 1550 (δ N-H) ; 1452 ; 1440 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1136 ; 1084 ; 1046 (ν C-O esters, ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,79-2,14 (28H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates, 4H_5) ; 2,25 (1H, m, NH) ; 2,47-2,57 (2H, dt, $J= 7,3$ Hz et 13,8 Hz, 2H_2) ; 2,84-3,88 (14H, m, 2H_2 , 4H_3 , 4H_4 , 4H_6) ; 3,97 (2H, m, 2H_{11}) ; 4,08 (2H, m, 2H_{12}) ; 4,27 (2H, m, 2H_{12}) ; 4,78-4,85 (2H, m, 2H_7) ; 5,18-5,33 (6H, m, 2H_8 , 2H_9 , 2H_{10}).

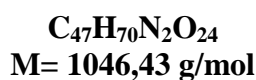
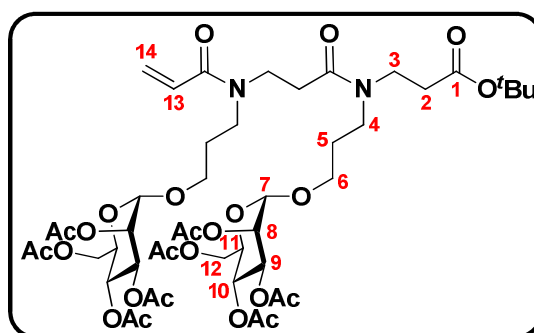
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ; 20,9 ($8\times\text{CH}_3$ acétates) ; 26,4 ; 26,5 ; 26,6 ; 26,7 ; 27,4 ; 28,0 ; 28,2 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, 2C_5) ; 29,3 ; 29,6 ; 33,7 ; 34,2 ; 42,0 ; 43,1 ; 43,5 ; 45,0 ; 45,1 ; 45,3 ; 46,4 ; 46,7 (2C_2 , 2C_3 , 2C_4) ; 62,4 (2C_{12}) ; 64,9 ; 65,6 ; 65,7 ; 65,9 ; 66,0 ; 66,1 ; 66,2 ; 68,5 ; 68,6 ; 68,7 ; 69,0 ; 69,1 ; 69,2 ; 69,4 ; 69,5 (2C_6 , 2C_8 , 2C_9 , 2C_{10} , 2C_{11}) ; 80,9 ; 81,5 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,3 ; 97,4 ; 97,5 ; 97,6 (2C_7) ; 169,6 ; 169,7 ; 169,9 ; 169,9 ; 170,1 ; 170,2 ; 170,3 ; 170,6 ; 170,7 ; 171,2 ; 171,5 ; 171,8 ($8\times\text{C}=\text{O}$ acétates, C_1 , $\text{C}=\text{O}$ plateforme peptoïde).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 993,4291$; trouvé 993,4240 (5,1 ppm).

$[\alpha]$ = +93 ($T= 25^\circ\text{C}$; $c= 0,13$; CHCl_3).

HPLC: 30,8 min (MeOH/ H_2O (0,1% TFA) 80:20).

Plateforme β -dipeptoïde *O*-Man 2.26



A une solution d'AcOEt anhydre (0,20 mL) contenant le dipeptoïde mannose **2.25** (1 éq, 0,042 mmol, 41,5 mg, 0.2 M) sous argon à 0°C , sont ajoutés goutte à goutte la triéthylamine (2,2 éq, 0,092 mmol, 13 μL) puis le chlorure d'acryloyle (1,2 éq, 0,05 mmol, 5 μL). La réaction est laissée sous agitation pendant 1h. Après l'ajout d'AcOEt (0,40 mL), le milieu réactionnel est filtré, concentré (huile orangée obtenue) puis purifié par chromatographie flash sur gel de silice

(DCM/MeOH 98:2). Le composé **2.26** est obtenu sous forme d'une huile orangée (0,27 mmol, 158 mg) avec un rendement de 85%.

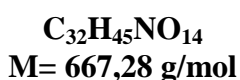
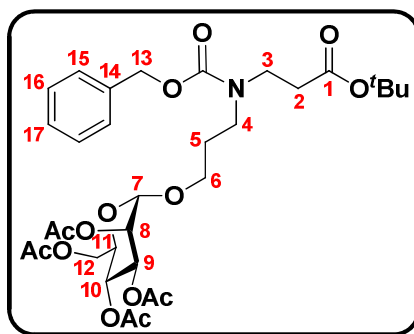
CCM: $R_f = 0,40$ (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2931 (ν Csp³-H) ; 1747 ; 1717 (ν C=O esters et amides) ; 1645 ; 1636 ; 1614 (ν C=C) ; 1455 ; 1433 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1221 ; 1136 ; 1084 ; 1047 (ν C-O, ν C-N) ; 980 ; 918 ; 796 (δ C-H alcène).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,43 (9H, m, 3×CH₃ ester de *tert*-butyle) ; 1,80-1,92 (4H, m, 4H₅) ; 1,97-2,14 (24H, m, 12×CH₃ acétates) ; 2,49-2,74 (4H, m, 2H₂) ; 3,31-3,73 (12H, m, 4H₃, 4H₄, 4H₆) ; 3,96 (2H, m, 2H₁₁) ; 4,08 (2H, m, 2H₁₂) ; 4,28 (2H, m, 2H₁₂) ; 4,79 (2H, m, 2H₇) ; 5,19-5,33 (6H, m, 2H₈, 2H₉, 2H₁₀) ; 5,72 (1H, m, H₁₄) ; 6,34 (1H, m, H_{14'}) ; 6,50-6,57 (1H, m, H₁₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,9 (8×CH₃ acétates) ; 27,6 ; 28,0 ; 28,1 ; 28,8 ; 29,0 ; 29,7 (3×CH₃ ester de *tert*-butyle, 2C₅) ; 31,4 ; 32,7 ; 33,7 ; 34,7 ; 34,9 (2C₂) ; 42,2 ; 42,3 ; 42,4 ; 43,1 ; 43,2 ; 43,3 ; 43,4 ; 43,5 ; 43,6 ; 43,7 ; 43,9 ; 44,1 ; 45,4 (2C₃, 2C₄) ; 62,4 (2C₁₂) ; 64,8 ; 65,1 ; 65,2 ; 66,0 ; 66,1 ; 66,3 ; 68,4 ; 68,5 ; 68,6 ; 68,7 ; 69,0 ; 69,1 ; 69,2 ; 69,4 ; 69,5 ; 69,6 (2C₆, 2C₈, 2C₉, 2C₁₀, 2C₁₁) ; 80,7 (C-(CH₃)₃) ; 97,5 ; 97,6 (2C₇) ; 127,2 ; 127,3 ; 127,5 ; 128,4 ; 128,5 ; 128,6 (C₁₃, C₁₄) ; 166,5 (C=O acrylamide) ; 169,6 ; 169,7 ; 169,8 ; 170,0 ; 170,5 ; 170,6 ; 171,1 ; 171,1 ; 171,2 (8×C=O acétates, C₁, C=O plateforme peptide).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+H]⁺ = 1047,4397 ; trouvé 1047,4360 (3,53 ppm) ; m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 1069,4216 ; trouvé 1069,4153 (5,89 ppm).

Monomère *O*-Man 2.28

Le monomère amine mannose **2.12** (1 éq, 0,624 mmol, 333 mg) est solubilisé dans du DCM (2,10 mL) sous argon à 0°C. Du chloroformate de benzyle (1,03 éq, 0,643 mmol, 91 µL) et de la triéthylamine (1,27 éq, 0,79 mmol, 0,11 mL) sont ajoutés à ce mélange. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et sous argon à 0°C pendant 24h. Du DCM est introduit et le milieu est lavé avec une solution d'acide citrique 10% (30 mL) et avec de l'eau distillée (2×30 mL et 1×22 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée. Le composé brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (Cyclohexane/AcOEt 60:40). Le produit **2.28** désiré est obtenu sous forme d'une huile incolore (0,54 mmol, 363 mg) avec un rendement de 87%.

CCM: $R_f = 0,34$ (Cyclohexane/AcOEt 60:40).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 1749 (ν C=O esters) ; 1701 (ν C=O carbamate) ; 1478 ; 1455 (ν C=C) ; 1447 ; 1422 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1221 ; 1153 ; 1135 ; 1084 ; 1047 (ν C-O, ν C-N) ; 980 ; 912 (δ C-H aromatiques).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,42 (9H, s, 3×CH₃ ester de *tert*-butyle) ; 1,80-1,87 (2H, m, 2H₅) ; 1,97 (3H, s, CH₃ acétate) ; 2,02 (3H, s, CH₃ acétate) ; 2,08 (3H, s, CH₃ acétate) ; 2,14 (3H, s, CH₃ acétate) ; 2,49 (2H, m, 2H₂) ; 3,35-3,47 (3H, m, 2H₄, H₆) ; 3,50 (2H, t, $J_{H3-H2} = 7,4$ Hz, 2H₃) ; 3,69 (1H, m, H₆) ; 3,97 (1H, m, H₁₁) ; 4,06 (1H, dd, $J_{H12 \text{ ou } H12'-H11} = 1,7$ Hz et $J_{H12-H12'} = 12,2$ Hz, H₁₂ ou H_{12'}) ; 4,27 (1H, m, H₁₂ ou H_{12'}) ; 4,77 (1H, m, H₇) ; 5,12 (2H, s, 2H₁₃) ; 5,20-5,33 (3H, m, H₈, H₉, H₁₀) ; 7,27-7,34 (5H, m, 2H₁₅, 2H₁₆, H₁₇).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ; 20,9 (8×CH₃ acétates) ; 28,0 (3×CH₃ ester de *tert*-butyle) ; 28,6 (C₅) ; 34,4 ; 35,1 (C₂) ; 43,2 ; 44,0 ; 44,7 ; 45,2 (C₃, C₄) ; 62,4 (C₁₂) ; 65,8 ; 66,1 ; 66,2 ; 67,0 ; 68,4 ; 68,9 ; 69,0 ; 71,5 (C₆, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₃) ; 80,7 ; 80,8 (C-

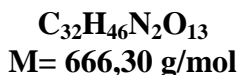
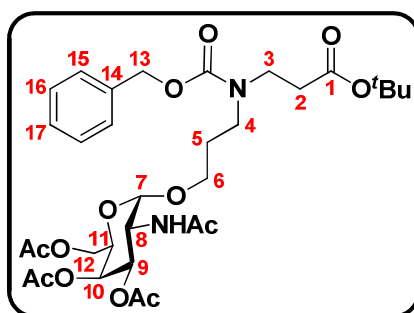
(CH₃)₃) ; 97,6 ; 97,7 (C₇) ; 127,7 ; 127,8 ; 127,9 ; 128,4 (2C₁₅, 2C₁₆, C₁₇) ; 136,6 ; 136,7 (C₁₄) ; 155,8 ; 155,9 ; 156,0 (C=O carbamate) ; 169,7 ; 169,8 ; 170,0 ; 170,6 (8×C=O acétates, C₁).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+H]⁺ = 668,2918 ; trouvé 668,2920 (0,3 ppm) ; m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 690,2738 ; trouvé 690,2728 (1,45 ppm).

[α]_D = +43 (T = 25°C ; c = 0,50 ; CHCl₃).

HPLC: 36,7 min (MeOH/H₂O (0,1% TFA) 70:30).

Monomère *O*-GalNAc **2.33**



Le monomère amine GalNAc **2.13** (1 éq, 0,37 mmol, 197 mg) est solubilisé dans du DCM (1,50 mL) sous argon à 0°C. Du chloroformiate de benzyle (1,03 éq, 0,38 mmol, 54 µL) et de la triéthylamine (1,27 éq, 0,47 mmol, 66 µL) sont ajoutés à ce mélange. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et sous argon à 0°C pendant 24h. Du DCM est introduit et le milieu est lavé avec une solution d'acide citrique 10% (20 mL) et avec de l'eau distillée (3×20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée puis concentrée. Le composé brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 98:2). Le produit **2.33** désiré est obtenu sous forme d'une huile jaune (0,29 mmol, 194 mg) avec un rendement de 80%.

CCM: R_f = 0,18 (AcOEt/Cyclohexane 40:60).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3323 (ν N-H) ; 2971 ; 2916 (ν C_{sp3}-H) ; 1748 ; 1722 ; 1695 ; 1684 (ν C=O esters, carbamate et acétamide) ; 1539 (δ N-H) ; 1478 ; 1453 (ν C=C) ; 1424 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1225 ; 1221 ; 1153 ; 1132 ; 1046 (ν C-O, ν C-N) ; 954 ; 845 (δ C-H aromatiques).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,42 (9H, s, 3×CH₃ de l'ester de *tert*-butyle) ; 1,73-1,88 (2H, m, 2H₅) ; 1,93-2,14 (12H, m, 3×CH₃ acétates, CH₃ acétamide) ; 2,45-2,56 (2H, m, 2H₂) ;

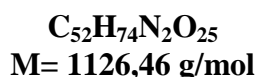
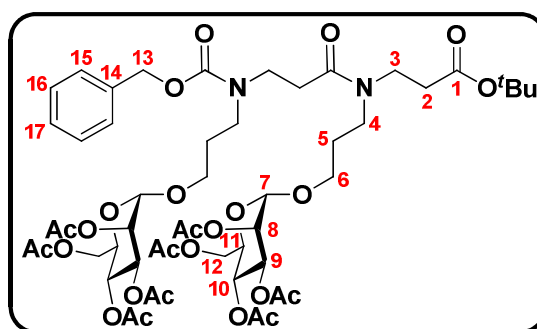
3,22-3,75 (6H, m, 2H₃, 2H₄, 2H₆) ; 4,06-4,18 (3H, m, H₁₁, 2H₁₂) ; 4,60 (1H, m, H₈) ; 4,78 (1H, m, H₇) ; 5,12 (3H, m, H₉, 2H₁₃) ; 5,34 (1H, m, H₁₀) ; 6,10-6,85 (1H, m, NHAc) ; 7,27-7,36 (5H, m, 2H₁₅, 2H₁₆, H₁₇).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 22,9 (3×CH₃ acétates, CH₃ acétamides) ; 27,5 (C₅) ; 28,0 (3×CH₃ de l'ester de tertbutyle) ; 34,7 ; 35,0 ; (C₂) ; 42,3 ; 42,4 ; 43,6 (C₃, C₄) ; 47,3 ; 47,4 ; 47,5 ; 47,6 (C₈) ; 61,9 (C₁₂) ; 64,1 (C₆) ; 66,7 ; 67,2 ; 67,3 ; 68,8 (C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₃) ; 81,0 (C-(CH₃)₃) ; 97,6 ; 97,7 (C₇) ; 127,6 ; 127,8 ; 128,0 (2C₁₅, 2C₁₆, C₁₇) ; 136,5 (C₁₄) ; 156,1 (C=O carbamate) ; 170,4 ; 170,7 (3×C=O acétates, C=O acétamide, C₁).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 689,2898 ; trouvé 689,2879 (1,9 ppm).

[α]_D = +19 (T = 25°C ; c = 0,50 ; CHCl₃).

Plateforme β-dipeptóide *O*-Man 2.30



La synthèse de la plateforme β-dipeptóide *O*-mannosylée **2.30** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale d'hydrolyse d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **2.28** (1 éq, 0,68 mmol, 452 mg)
- Du TFA (4,80 mL)
- Du DCM (4,80 mL)

L'acide carboxylique **2.29** est obtenu au bout de 30 min d'agitation, sous forme d'une huile orangée de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique (méthode monomère), en utilisant:

- L'acide carboxylique **2.29** formé ci-dessus (1 éq, 0,68 mmol)
- Le monomère amine mannose **2.12** (1 éq, 0,68 mmol, 361 mg)
- HATU (2 éq, 1,35 mmol, 515 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 1,69 mmol, 0,28 mL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 5,90 mL et 2,50 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 20h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 98:2), le composé **2.30** est obtenu sous forme d'une huile jaune (0,62 mmol, 701 mg) avec un rendement de 92%.

CCM: $R_f = 0,42$ (DCM/MeOH 98:2).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 1748 (ν C=O esters) ; 1699 ; 1643 (ν C=O amides et carbamate) ; 1480 (ν C=C) ; 1440 ; 1422 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1221 ; 1136 ; 1084 ; 1047 (ν C-O, ν C-N) ; 980 ; 915 (δ C-H aromatiques).

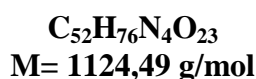
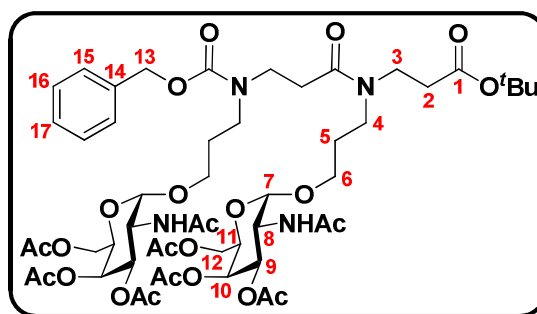
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,41 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,69-1,86 (4H, m, 4H_5) ; 1,95 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,01 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,07 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,12 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,33-2,68 (4H, m, 4H_2) ; 3,24-3,70 (12H, m, 4H_3 , 4H_4 , 4H_6) ; 3,94 (2H, m, 2H_{11}) ; 4,05 (2H, m, 2H_{12}) ; 4,26 (2H, dd, $J_{\text{H}12 \text{ ou } \text{H}12'-\text{H}11} = 4,8 \text{ Hz}$ et $J_{\text{H}12-\text{H}12'} = 12,1 \text{ Hz}$, 2H_{12}) ; 4,75 (2H, m, 2H_7) ; 5,19 (2H, s, 2H_{13}) ; 5,19-5,31 (6H, m, 2H_8 , 2H_9 , 2H_{10}) ; 7,27-7,33 (5H, m, 2H_{15} , 2H_{16} , H_{17}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,5 ; 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ($8\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,5 ; 27,9 ; 28,5 ; 28,7 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, 2C_5) ; 31,6 ; 31,3 ; 33,8 ; 34,7 ; 34,8 (2C_2) ; 42,4 ; 43,1 ; 43,2 ; 43,5 ; 43,7 ; 44,4 ; 44,6 ; 45,1 ; 45,5 (2C_3 , 2C_4) ; 62,4 (2C_{12}) ; 65,2 ; 65,9 ; 66,0 ; 66,2 ; 66,9 ; 67,0 ; 68,4 ; 68,5 ; 68,6 ; 69,0 ; 69,4 ; 69,4 (2C_6 , 2C_8 , 2C_9 , 2C_{10} , 2C_{11} , C_{13}) ; 80,6 ; 81,2 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,5 ; 97,7 (2C_7) ; 127,7 ; 127,9 ; 128,0 ; 128,4 (2C_{15} , 2C_{16} , C_{17}) ; 136,6 ; 136,7 (C_{14}) ; 155,9 ($\text{C}=\text{O}$ carbamate) ; 169,6 ; 169,7 ; 169,8 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,5 ; 171,1 ($8\times\text{C}=\text{O}$ acétates, C_1 , $\text{C}=\text{O}$ plateforme peptidoïde).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}/2 = 575,2279$; trouvé 575,2244 (6,08 ppm).

$[\alpha]$ = +37 ($T = 25^\circ\text{C}$; $c = 0,50$; CHCl_3).

HPLC: 11,3 min (MeOH/ H_2O (0,1% TFA) 80:20).

Plateforme β -dipeptotide *O*-GalNAc **2.35**

La synthèse de la plateforme β -dipeptotide *O*-GalNAc **2.35** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **2.33** (1 éq, 0,28 mmol, 183 mg)
- Du TFA (2,00 mL)
- Du DCM (2,00 mL)

L'acide carboxylique **2.34** est obtenu au bout de 30 min d'agitation, sous forme d'une huile orangée de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique (méthode monomère), en utilisant:

- L'acide carboxylique **2.34** formé ci-dessus (1 éq, 0,28 mmol)
- Le monomère amine GalNAc **2.13** (1 éq, 0,28 mmol, 146 mg)
- HATU (2 éq, 0,55 mmol, 209 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,69 mmol, 0,11 mL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 2,40 mL et 1,00 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 20h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 97:3), le composé **2.35** est obtenu sous forme d'une huile jaune-orangée (0,22 mmol, 245 mg) avec un rendement de 80%.

CCM: $R_f = 0,34$ (DCM/MeOH 96:4).

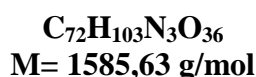
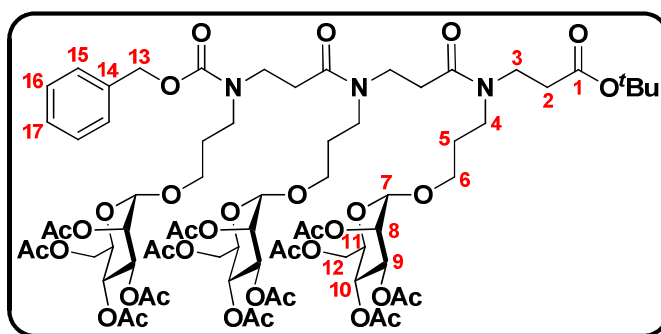
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3335 (ν N-H) ; 2952 (ν C_{sp3}-H) ; 1747 ; 1676 ; 1664 ; 1641 (ν C=O esters, carbamate et acétamides) ; 1539 (δ N-H) ; 1478 (ν C=C) ; 1424 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1222 ; 1153 ; 1131 ; 1073 ; 1045 (ν C-O, ν C-N) ; 949 ; 846 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,41, 1,43 (9H, s, 3 \times CH₃ de l'ester de *tert*-butyle) ; 1,57-1,86 (4H, m, 4H₅) ; 1,90-2,14 (24H, m, 6 \times CH₃ acétates, 2 \times CH₃ acétamides) ; 2,30-2,76 (4H, m, 4H₂) ; 3,28-3,74 (12H, m, 4H₃, 4H₄, 4H₆) ; 4,02-4,26 (6H, m, 2H₁₁, 4H₁₂) ; 4,60 (2H, m, 2H₈) ; 4,85 (2H, m, 2H₇) ; 5,11 (4H, m, 2H₉, 2H₁₃) ; 5,35 (2H, m, 2H₁₀) ; 6,33-7,07 (2H, m, 2 \times NHAc) ; 7,28-7,36 (5H, m, 2H₁₅, 2H₁₆, H₁₇).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ; 22,9 ; 23,0 ; 23,1 (6 \times CH₃ acétates, 2 \times CH₃ acétamides) ; 27,4 ; 27,5 ; 27,6 ; 27,7 ; 28,0 ; 28,8 ; 29,2 (3 \times CH₃ de l'ester de *tert*-butyle, 2C₅) ; 32,0 ; 32,1 ; 32,3 ; 33,8 ; 34,0 ; 34,8 ; 35,0 (2C₂) ; 41,7 ; 42,1 ; 42,5 ; 43,0 ; 43,1 ; 43,3 ; 43,8 ; 44,0 ; 44,9 ; 45,3 ; 45,8 (2C₃, 2C₄) ; 47,3 ; 47,4 ; 47,5 ; 47,6 ; 47,7 (2C₈) ; 61,8 ; 62,0 ; 62,1 ; 62,2 (2C₁₂) ; 64,1 ; 64,2 ; 64,3 ; 64,4 ; 64,5 ; 64,8 ; 64,9 ; 65 (2C₆) ; 66,5 ; 66,6 ; 67,0 ; 67,1 ; 67,2 ; 67,3 ; 68,0 ; 68,6 (2C₉, 2C₁₀, 2C₁₁, C₁₃) ; 81,1 (C-(CH₃)₃) ; 97,5 ; 97,6 ; 97,7 ; 97,8 (2C₇) ; 127,4 ; 127,9 ; 128 ; 128,1 ; 128,2 ; 128,3 ; 128,6 (2C₁₅, 2C₁₆, C₁₇) ; 136,4 ; 136,5 (C₁₄) ; 156,5 (C=O carbamate) ; 170,3 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 171,4 ; 171,5 (6 \times C=O acétates, 2 \times C=O acétamides, C=O plateforme peptöide, C₁).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}/2 = 585,2348$; trouvé 585,2351 (0,51 ppm).

$[\alpha]$ = +32 (T= 25°C ; c= 0,13 ; CHCl_3).

Plateforme β -tripeptoïde *O*-Man 2.32

La synthèse de la plateforme β -tripeptoïde *O*-mannosylée **2.32** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale d'hydrolyse d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **2.30** (1 éq, 0,13 mmol, 151 mg)
- Du TFA (0,95 mL)
- Du DCM (0,95 mL)

L'acide carboxylique **2.31** est obtenu au bout de 30 min d'agitation, sous forme d'une huile orangée de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique (méthode monomère), en utilisant:

- L'acide carboxylique **2.31** formé ci-dessus (1 éq, 0,13 mmol)
- Le monomère amine mannose **2.12** (1 éq, 0,13 mmol, 72 mg)
- HATU (2 éq, 0,27 mmol, 102 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,34 mmol, 55 μL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 1,20 mL et 0,50 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 20h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 98:2), le composé **2.32** est obtenu sous forme d'une huile incolore (0,11 mmol, 170 mg) avec un rendement de 80%.

CCM: $R_f = 0,28$ (DCM/MeOH 98:2).

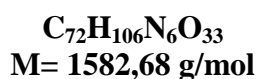
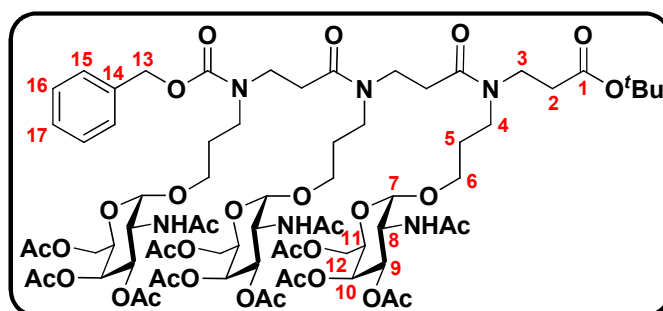
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 1746 ; 1732 (ν C=O esters) ; 1704 ; 1641 (ν C=O amides et carbamate) ; 1480 (ν C=C) ; 1447 ; 1423 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1220 ; 1135 ; 1082 ; 1046 (ν C-O, ν C-N) ; 980 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,72-1,88 (6H, m, 6H_5) ; 1,96-2,14 (36H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,47-2,69 (6H, m, 6H_2) ; 3,31-3,71 (18H, m, 6H_3 , 6H_4 , 6H_6) ; 3,97 (3H, m, 3H_{11}) ; 4,08 (3H, m, 3H_{12}) ; 4,28 (3H, dd, $J_{\text{H}_{12}\text{ ou } \text{H}_{12'}-\text{H}_{11}} = 4,5$ Hz et $J_{\text{H}_{12}-\text{H}_{12'}} = 12,2$ Hz, 3H_{12}) ; 4,76 (3H, m, 3H_7) ; 5,11 (2H, s, 2H_{13}) ; 5,18-5,31 (9H, m, 3H_8 , 3H_9 , 3H_{10}) ; 7,27-7,34 (5H, m, 2H_{15} , 2H_{16} , H_{17}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,3 ; 20,4 ; 20,5 ; 20,6 ($12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,3 ; 27,4 ; 27,8 ; 27,9 ; 28,4 ; 28,5 ; 28,6 ; 29,4 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, 3C_5) ; 31,2 ; 31,5 ; 31,7 ; 31,8 ; 31,9 ; 32,0 ; 32,1 ; 33,6 ; 34,5 ; 34,7 (3C_2) ; 42,1 ; 42,2 ; 42,7 ; 42,8 ; 42,9 ; 43,3 ; 43,4 ; 44,4 ; 44,5 ; 44,9 ; 45,1 ; 45,3 (3C_3 , 3C_4) ; 62,2 (3C_{12}) ; 65,0 ; 65,1 ; 65,9 ; 66,0 ; 66,1 ; 66,7 ; 68,2 ; 68,4 ; 68,5 ; 68,7 ; 68,8 ; 68,9 ; 69,0 ; 69,1 ; 69,2 ; 69,3 (3C_6 , 3C_8 , 3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11} , C_{13}) ; 80,4 ; 80,5 ; 81,0 ; 81,1 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,3 ; 97,4 ; 97,5 (3C_7) ; 127,5 ; 127,6 ; 127,7 ; 128,3 (2C_{15} , 2C_{16} , C_{17}) ; 136,6 (C_{14}) ; 155,6 ; 155,7 ($\text{C}=\text{O}$ carbamate) ; 169,4 ; 169,5 ; 169,6 ; 169,7 ; 170,1 ; 170,2 ; 170,4 ; 170,6 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,0 ($12\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptôïde, C_1).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}/2 = 804,8155$; trouvé 804,8148 (0,87 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}/2 = 812,8025$; trouvé 812,8035 (0,12 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}/2 = 815,8059$; trouvé 815,8054 (0,61 ppm).

HPLC: 11,6 min (MeOH/ H_2O (0,1% TFA) 80:20).

Plateforme β -tripeptoïde *O*-GalNAc **2.37**

La synthèse de la plateforme β -dipeptoïde *O*-GalNAc **2.37** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **2.35** (1 éq, 0,23 mmol, 256 mg)
- Du TFA (1,80 mL)
- Du DCM (1,80 mL)

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 20h. L'acide carboxylique **2.36** est obtenu au bout de 30 min d'agitation, sous forme d'une huile orangée de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique (méthode monomère), en utilisant:

- L'acide carboxylique **2.36** formé ci-dessus (1 éq, 0,23 mmol)
- Le monomère amine GalNAc **2.13** (1 éq, 0,23 mmol, 121 mg)
- HATU (2 éq, 0,46 mmol, 173 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,57 mmol, 94 μL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 2,00 mL et 0,80 mL

Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 96:4), le composé **2.37** est obtenu sous forme d'une huile jaune (0,07 mmol, 108 mg) avec un rendement de 30%.

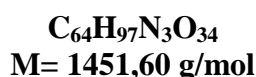
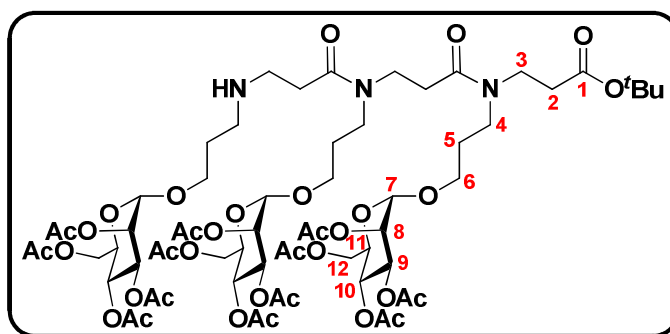
CCM: $R_f = 0,30$ (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3340 (ν N-H) ; 2962 (ν C_{sp^3} -H) ; 1748 ; 1733 ; 1684 ; 1637 (ν C=O esters, carbamate et acétamides) ; 1540 (δ N-H) ; 1472 (ν C=C) ; 1432 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1222 ; 1158 ; 1129 ; 1075 ; 1045 (ν C-O, ν C-N) ; 952 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$ de l'ester de *tert*-butyle) ; 1,71-1,86 (6H, m, 6H_5) ; 1,89-2,16 (36H, m, $9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 2,30-2,78 (6H, m, 6H_2) ; 3,32-3,73 (18H, m, 6H_3 , 6H_4 , 6H_6) ; 4,03-4,25 (9H, m, 3H_{11} , 6H_{12}) ; 4,60 (3H, m, 3H_8) ; 4,86 (3H, m, 3H_7) ; 5,11 (5H, m, 3H_9 , 2H_{13}) ; 5,36 (3H, m, 3H_{10}) ; 6,59-7,46 (8H, m, $3\times\text{NHAc}$, 2H_{15} , 2H_{16} , H_{17}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ; 22,7 ; 22,8 ; 22,9 ; 23,0 ($9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 27,4 ; 27,5 ; 27,6 ; 27,7 ; 27,9 ; 28,0 ; 28,9 ; 29,4 ($3\times\text{CH}_3$ de l'ester de *tert*butyle, 3C_5) ; 32,1 ; 32,2 ; 32,4 ; 33,9 ; 34,0 ; 34,9 ; 35,1 (3C_2) ; 41,8 ; 42,2 ; 42,5 ; 43,0 ; 43,1 ; 43,4 ; 43,9 ; 44,0 ; 44,8 ; 45,2 ; 45,9 (3C_3 , 3C_4) ; 47,3 ; 47,4 ; 47,5 ; 47,6 (3C_8) ; 61,7 ; 61,8 ; 61,9 ; 62,0 (2C_{12}) ; 64,2 ; 64,3 ; 64,4 ; 64,5 ; 64,6 ; 64,9 ; 64,9 ; 65,0 (3C_6) ; 66,4 ; 66,5 ; 66,6 ; 67,0 ; 67,2 ; 67,3 ; 67,9 ; 68,2 ; 68,4 ; 68,5 (3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11} , C_{13}) ; 81,2 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,5 ; 97,6 ; 97,7 ; 97,8 (3C_7) ; 127,4 ; 127,5 ; 127,7 ; 128,1 ; 128,2 ; 128,6 ; 128,8 (2C_{15} , 2C_{16} , C_{17}) ; 136,4 ; 136,5 (C_{14}) ; 157,0 ($\text{C}=\text{O}$ carbamate) ; 170,3 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,4 ($9\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $3\times\text{C}=\text{O}$ acétamides, $2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptoïde, C_1).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 792,3479$; trouvé 792,3438 (5,1 ppm) ; $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}/2 = 811,3196$; $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}/2 = 814,3284$.

Plateforme β -tripeptoïde *O*-Man 2.27

A une solution contenant la plateforme β -tripeptoïde *O*-mannosylée **2.32** (1 éq, 0,03 mmol, 50 mg) et du Pd/C (10 mg, 20 mol%) dans de l'AcOEt (8,00 mL) dans un autoclave à hydrogénation est ajouté du CH₃COOH glacial (48 μ L, 0,6 vol%). L'ensemble est placé à température ambiante sous 4 bars de dihydrogène pendant 4h. Le milieu est ensuite filtré sur célite puis concentré. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (gradient : DCM/MeOH 95:5 puis 90:10). Enfin le composé **2.27** est obtenu sous forme d'une huile jaune clair (0,02 mmol, 32,5 mg) avec un rendement de 70%.

CCM: $R_f = 0,33$ (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 2949 ; 2916 (ν C_{sp3}-H) ; 1745 ; 1741 (ν C=O esters) ; 1641 (ν C=O amides) ; 1452 ; 1440 ; 1431 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1224 ; 1137 ; 1082 ; 1045 (ν C-O, ν C-N).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,42 (9H, m, 3 \times CH₃ ester de *tert*-butyle) ; 1,78-2,14 (42H, m, 12 \times CH₃ acétates, 6H₅) ; 2,24 (1H, m, NH) ; 2,47-2,79 (4H, m, 4H₂) ; 2,93-3,86 (20H, m, 2H₂, 6H₃, 6H₄, 6H₆) ; 3,96 (3H, m, 3H₁₁) ; 4,07 (3H, m, 3H₁₂) ; 4,27 (3H, dd, $J_{H12 \text{ ou } H12'-H11} = 5,2 \text{ Hz}$ et $J_{H12-H12'} = 12,0 \text{ Hz}$, 3H₁₂) ; 4,77-4,84 (3H, m, 3H₇) ; 5,17-5,34 (9H, m, 3H₈, 3H₉, 3H₁₀).

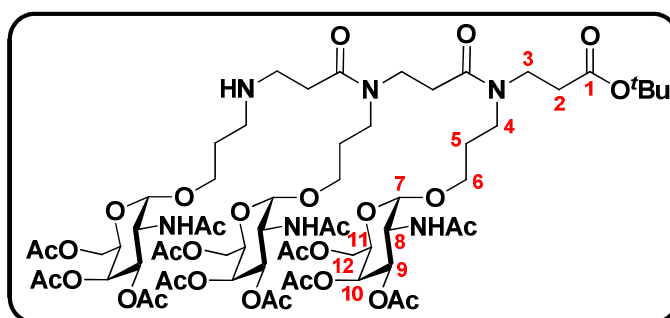
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,7 ; 20,8 ; 20,9 ; 21,0 ; 21,1 (12 \times CH₃ acétates) ; 26,4 ; 26,5 ; 26,6 ; 27,4 ; 27,5 ; 27,7 ; 27,8 ; 28,2 ; 28,3 ; 28,8 ; 28,9 ; 29,1 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,8 (3 \times CH₃ ester de *tert*-butyle, 3C₅) ; 31,3 ; 31,5 ; 31,6 ; 32,1 ; 33,9 ; 34,0 ; 34,8 ; 35 ; 42,3 ; 42,5 ; 42,7 ; 43,0 ; 43,1 ; 43,3 ; 43,6 ; 43,8 ; 45,1 ; 45,2 ; 45,4 ; 45,5 ; 46,4 ; 46,5 ; 46,6 (3C₂, 3C₃, 3C₄) ; 62,6 (3C₁₂) ; 65,0 ; 65,2 ; 65,3 ; 65,6 ; 65,7 ; 65,8 ; 66,0 ; 66,1 ; 66,2 ; 66,4 ; 66,5 ; 68,7 ; 68,8 ; 68,9 ; 69,2 ; 69,2 ; 69,3 ; 69,4 ; 69,5 ; 69,6 ; 69,7 (3C₆, 3C₈, 3C₉, 3C₁₀, 3C₁₁) ; 80,9 ; 81,5 (C-(CH₃)₃) ; 97,4 ; 97,6 ; 97,7 ; 97,8 (3C₇) ; 169,7 ; 169,8 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,1 ; 170,2 ; 170,3 ;

170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,3 ; 171,4 ; 171,6 ; 171,7 ; 171,9
(12×C=O acétates, 2×C=O plateforme peptidoïde, C₁).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+H]²⁺/2 = 726,8055 ; trouvé 726,8067 (1,65 ppm) ;
m/z calculé pour [M+H+K]²⁺/2 = 745,7835 ; trouvé 745,7787 (6,44 ppm).

HPLC: 1,8 min (MeOH/H₂O (0,1% TFA) 70:30).

Plateforme β-tripeptidoïde *O*-GalNAc **2.38**



A une solution contenant la plateforme β-tripeptidoïde *O*-GalNAc **2.37** (1 éq, 0,03 mmol, 50 mg) et du Pd/C (10 mg, 20 mol%) dans de l'AcOEt (8,00 mL) dans un autoclave à hydrogénation est ajouté du CH₃COOH glacial (48 μL, 0,6 vol%). L'ensemble est placé à température ambiante sous 4 bars de dihydrogène pendant 4h. Le milieu est ensuite filtré sur célite puis concentré. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (gradient : DCM/MeOH 95:5, 90:10 puis 85:15). Enfin le composé **2.38** est obtenu sous forme d'une huile jaune clair (0,02 mmol, 29 mg) avec un rendement de 71%.

CCM: R_f = 0,60 (DCM/MeOH : 90:10).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3322 (ν N-H acétamides et plateforme β-tripeptidoïde) ; 2942 (ν C_{sp3}-H) ; 1745 ; 1732 ; 1654 ; 1636 (ν C=O esters et amides) ; 1542 ; 1536 (δ N-H acétamides et plateforme β-tripeptidoïde) ; 1432 ; 1426 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1222 ; 1225 ; 1156 ; 1130 ; 1048 ; 1036 (ν C-O, ν C-N).

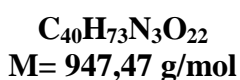
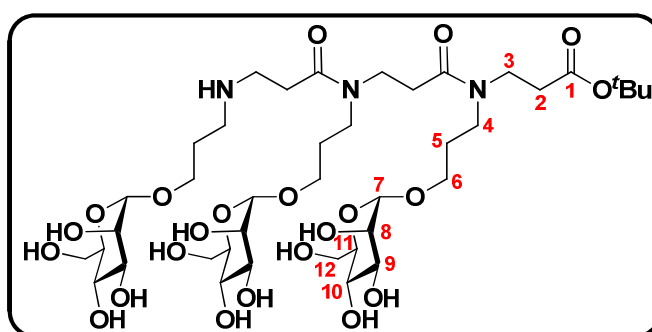
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,39-1,42 (9H, m, 3×CH₃ ester de tertbutyle) ; 1,70-2,13 (43H, m, 9×CH₃ acétates, 3×CH₃ acétamides, 6H₅, NH plateforme β-tripeptidoïde) ; 2,18-2,83 (6H,

m, 6H₂) ; 2,90-4,01 (18H, m, 6H₃, 6H₄, 6H₆) ; 4,03-4,36 (9H, m, 3H₁₁, 6H₁₂) ; 4,58 (3H, m, 3H₈) ; 4,82-5,00 (3H, m, 3H₇) ; 5,13 (3H, m, 3H₉) ; 5,36 (3H, m, 3H₁₀) ; 6,54-7,45 (3H, m, 3×NHAc).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,7 ; 20,8 ; 20,9 ; 22,8 ; 22,9 ; 23,0 ; 23,1 ; 23,2 (9×CH₃ acétates, 3×CH₃ acétamides) ; 27,3 ; 27,4 ; 27,5 ; 28,0 ; 28,6 ; 28,9 ; 29,0 ; 29,1 ; 29,6 (3×CH₃ ester de *tert*-butyle, 3C₅) ; 31,3 ; 31,6 ; 31,8 ; 33,8 ; 33,8 ; 33,9 ; 34,6 ; 34,7 ; 34,8 (3C₂) ; 41,9 ; 42,1 ; 42,3 ; 42,4 ; 42,5 ; 42,7 ; 42,9 ; 43,0 ; 43,1 ; 43,9 ; 44,0 ; 44,9 ; 45,2 ; 45,3 ; 45,4 ; 45,5 ; 47,2 ; 47,4 ; 47,5 ; 47,6 ; 47,7 ; 47,8 ; 47,9 ; 48,2 ; 48,3 (3C₃, 3C₄, 3C₈) ; 61,7 ; 61,8 ; 62,1 ; 62,2 ; 62,3 ; 62,4 ; 62,5 (3C₁₂) ; 64,5 ; 64,7 ; 64,9 ; 65,0 ; 66,4 ; 66,5 ; 66,6 ; 66,7 ; 67,2 ; 67,3 ; 67,7 ; 67,8 ; 68,1 ; 68,4 ; 68,5 (3C₆, 3C₉, 3C₁₀, 3C₁₁) ; 81,1 ; 81,6 (C-(CH₃)₃) ; 97,6 ; 97,7 ; 97,8 ; 97,9 (3C₇) ; 170,2 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,8 ; 170,0 ; 171,1 ; 171,9 ; 172,1 (9×C=O acétates, 3×C=O acétamides, 2×C=O plateforme peptidique, C₁).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+2H]²⁺/2 = 725,3295 ; trouvé 725,3262 (4,5 ppm) ; [M+Na+H]²⁺/2 = 736,3177 ; [M+H]⁺ = 1449,5292.

Plateforme β-tripeptidique *O*-Man(OH) **2.39**



Une solution contenant la plateforme β-tripeptidique *O*-mannosylée **2.27** (0,0094 mmol, 13,7 mg) diluée dans 2,50 mL de MeOH anhydre, est traitée par 0,25 mL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH= 8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **2.39** sous forme de solide blanc (0,0094 mmol, 8 mg) de manière quantitative.

CCM: R_f = 0,35 (Propanol/H₂O 70:30).

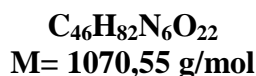
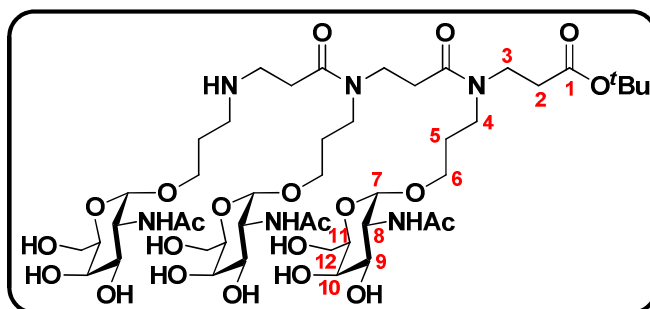
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3517-3168 (ν N-H, O-H) ; 2926 ; 2857 (ν C_{sp^3} -H) ; 1715 ; 1656 ; 1630 ; 1625 (ν C=O ester et amides) ; 1555 ; 1475 (δ N-H) ; 1345 (δ C-H) ; 1233 ; 1154 ; 1123 ; 1060 ; 1047 (ν C-O, ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1,42 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,80-2,09 (6H, m, 6H_5) ; 2,50-3,00 (6H, m, 6H_2) ; 3,20-3,90 (36H, m, 6H_3 , 6H_4 , 6H_6 , 3H_8 , 3H_9 , 3H_{10} , 3H_{11} , 6H_{12}) ; 4,70 (3H, m, 3H_7).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 27,3 ; 28,5 ; 28,7 ; 29,5 ; 29,7 ; 30,0 ; 30,1 ; 30,2 ; 30,3 ; 30,5 ; 30,6 (3C_5 , $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 32,3 ; 33,5 ; 34,0 ; 34,1 ; 35,2 ; 35,4 (3C_2) ; 40,4 ; 40,6 ; 43,1 ; 44,1 ; 44,5 ; 44,7 ; 45,7 ; 47,1 ; 47,2 ; 59,6 ; 63,1 ; 65,2 ; 65,6 ; 65,7 ; 66,2 ; 66,3 ; 67,6 ; 68,9 ; 69,0 ; 71,2 ; 72,6 ; 72,8 ; 72,9 ; 74,5 ; 75,0 (C_3 , 3C_4 , 3C_6 , 3C_7 , 3C_8 , 3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11} , C_{12}) ; 81,4 ; 82,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 97,5 ; 97,7 ; 97,8 ; 98,0 (3C_7) ; 172,7 ; 173,4 ; 173,5 ; 173,7 ; 173,8 ; 173,9 ; 174,0 ; 174,1 ; 174,2 ; 174,3 ; 174,4 ($2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptidique, C_1).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 948,4764$; trouvé 948,4776 (1,3 ppm).

Plateforme β -tripeptidique *O*-GalNAc(OH) **2.40**



Une solution contenant la plateforme β -tripeptidique *O*-GalNAc **2.38** (0,0049 mmol, 7,1 mg) diluée dans 1,30 mL de MeOH anhydre, est traitée par 0,13 mL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH= 8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+). La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **2.40** sous forme de solide blanc (0,0049 mmol, 5,2 mg) de manière quantitative.

CCM: $R_f = 0,22$ (Propanol/ H_2O 70:30).

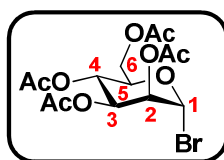
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3514-3160 (ν N-H, O-H) ; 2926 ; 2853 (ν C_{sp^3} -H) ; 1710 ; 1653 ; 1634 ; 1623 (ν C=O ester et amides) ; 1554 ; 1467 (δ N-H) ; 1342 (δ C-H alkyles) ; 1233 ; 1154 ; 1123 ; 1058 ; 1041 (ν C-O, ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1,42 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,80-2,09 (15H, m, 6H_5 , $3\times\text{CH}_3$ acétamide) ; 2,50-3,00 (6H, m, 6H_2) ; 3,20-3,90 (33H, m, 6H_3 , 6H_4 , 6H_6 , 3H_9 , 3H_{10} , 3H_{11} , 6H_{12}) ; 4,30 (3H, m, 3H_8) ; 4,70 (3H, m, 3H_7).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 23,8 ; 23,9 ; 24,0 ($3\times\text{CH}_3$ acétamide) ; 27,4 ; 27,5 ; 27,6 ; 28,4 ; 28,5 ; 28,6 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 30,2 ; 30,3 ; 30,4 ; 30,7 ; 30,8 ; 32,3 ; 32,4 ; 32,5 ; 34,7 ; 35,4 ; 35,5 ; 35,6 (3C_2 , 3C_5 , $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 43,5 ; 43,6 ; 43,7 ; 43,8 ; 43,9 ; 44,1 ; 44,5 ; 44,6 ; 44,7 ; 44,8 ; 45,5 ; 45,6 ; 45,7 ; 47,0 ; 47,1 ; 47,5 ; 47,6 ; 47,7 ; 47,9 ; 51,6 ; 51,7 ; 62,9 ; 63,1 ; 65,8 ; 66,0 ; 66,1 ; 66,2 ; 66,3 ; 66,4 ; 66,5 ; 66,6 ; 66,7 ; 66,8 ; 67,0 ; 67,1 ; 67,2 ; 69,2 ; 69,3 ; 69,5 ; 69,6 ; 69,7 ; 69,8 ; 69,9 ; 72,7 ; 72,8 ; 72,9 ; 73,0 (3C_3 , 3C_4 , 3C_6 , 3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11} , 3C_{12}) ; 82,1 ; 82,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 98,6 ; 98,8 ; 98,9 ; 99,0 ; 99,3 (3C_7) ; 172,4 ; 172,5 ; 172,6 ; 172,7 ; 172,9 ; 173,2 ; 173,3 ; 173,4 ; 173,8 ; 173,9 ; 174,0 ; 174,1 ($2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptoidé, $3\times\text{C}=\text{O}$ acétamides, C_1).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 536,2819$; trouvé 536,2825 (1,1 ppm).

1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acétyl- α -D-mannopyranoside **2.44**



$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrO}_9$
M= 410,02 g/mol

A une solution contenant de l'acide perchlorique (0,20 mL) dissout dans de l'anhydride acétique (7,5 éq, 207,7 mmol, 19,6 mL), est ajouté par portion de D-mannose (1 éq, 27,7 mmol, 5,00 g) pendant 1h, en maintenant la température en dessous de 40°C. Ensuite, à température ambiante, le bromure d'hydrogène 33% dans l'acide acétique (22 mL) est versé. Après 1h30 d'agitation, le mélange est dilué dans du DCM (60 mL) puis lavé avec une solution aqueuse de NaHCO_3 à 5% jusqu'à ce que le pH de la phase aqueuse soit égal à 8. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 et concentrée. Le composé bromé **2.44** est obtenu sous forme d'une huile jaune orangé (10,77 g, 26,2 mmol) avec un rendement de 99%.

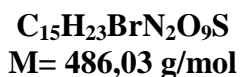
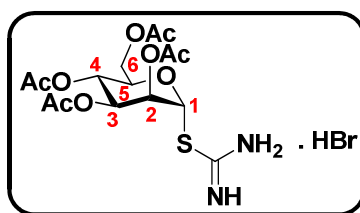
CCM: $R_f = 0,61$ (AcOEt/Cyclohexane 50:50).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 1749 (ν C=O) ; 1432 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1217 ; 1163 ; 1129 ; 1050 (ν C-O).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,98 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,04 (2H, m, 2H_8) ; 2,07 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,14 (3H, s, CH_3 acétate) ; 4,10 (1H, dd, $J_{\text{H6 ou H6}'\text{-H5}} = 2,1$ Hz et $J_{\text{H6-H6}'} = 12,5$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,19 (1H, ddd, $J_{\text{H5-H6 ou H6}'} = 2,1$ Hz, $J_{\text{H5-H6 ou H6}'} = 4,9$ Hz et $J_{\text{H5-H4}} = 10,2$ Hz, H_5) ; 4,29 (1H, dd, $J_{\text{H6 ou H6}'\text{-H5}} = 4,9$ Hz et $J_{\text{H6-H6}'} = 12,5$ Hz, H_6 ou H_6') ; 5,33 (1H, t, $J_{\text{H4-H3}} = J_{\text{H4-H5}} = 10,2$ Hz, H_4) ; 5,41 (1H, dd, $J_{\text{H2-H1}} = 1$ Hz et $J_{\text{H2-H3}} = 3,4$ Hz, H_2) ; 5,68 (1H, dd, $J_{\text{H3-H2}} = 3,4$ Hz et $J_{\text{H3-H4}} = 10,2$ Hz, H_3) ; 6,27 (1H, d, $J_{\text{H1-H2}} = 1$ Hz, H_1).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,4 ; 20,5 ; 20,6 ; 20,7 ($4 \times \text{CH}_3$ acétates) ; 61,4 (C_6) ; 65,2 (C_4) ; 67,8 (C_3) ; 72,0 (C_2) ; 72,7 (C_5) ; 83,0 (C_1) ; 169,5 ; 169,6 ; 170,5 ($4 \times \text{C}=\text{O}$ acétates).

Bromure de (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-1-isothiouronium 2.45



Dans une solution d'acétone anhydre (10 mL), est introduit le composé bromé **2.44** (1 éq, 15,4 mmol, 6,34 g). A ce mélange, est ajouté de la thiourée anhydre (1,2 éq, 18,5 mmol, 1,41 g) et le tout est chauffé au reflux pendant 2h sous argon. Après évaporation, du DCM (20 mL) est ajouté et le précipité de thiourée formé est filtré. Le filtrat est concentré et le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (gradient passant d'AcOEt à un mélange AcOEt/MeOH 90:10). La solide obtenu est recristallisé à froid dans un mélange acétone, diéthyléther 1:1 pour donner le composé désiré **2.45** (1,43 g, 3,52 mmol) sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 29%.

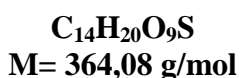
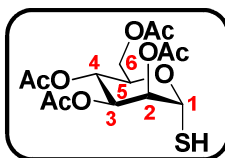
CCM: $R_f = 0,24$ (AcOEt/MeOH 90:10).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3380 ; 3371 (ν N-H) ; 3040 (ν C_{sp^2} -H) ; 1756 ; 1735 (ν C=O) ; 1657 ; 1641 (ν C=N) ; 1433 ; 1368 (δ C-H alkyles) ; 1238 ; 1225 ; 1109 ; 1067 ; 1052 (ν C-O, ν C-N) ; 750 (ν C-S).

RMN ^1H (400 MHz, Acétone- d_6) δ (ppm): 2,00-2,20 ($4\times\text{CH}_3$ acétates) ; 4,23 (1H, dd, $J_{\text{H}6 \text{ ou } \text{H}6'-\text{H}5} = 2,4$ Hz et $J_{\text{H}6-\text{H}6'} = 12,4$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,31 (1H, dd, $J_{\text{H}6 \text{ ou } \text{H}6'-\text{H}5} = 6,0$ Hz et $J_{\text{H}6-\text{H}6'} = 12,4$ Hz, H_6 ou H_6') ; 4,53 (1H, m, H_5) ; 5,16 (1H, dd, $J_{\text{H}3-\text{H}2} = 3,4$ Hz et $J_{\text{H}3-\text{H}4} = 10,0$ Hz, H_3) ; 5,34 (1H, t, $J_{\text{H}4-\text{H}3} = J_{\text{H}4-\text{H}5} = 10,0$ Hz, H_4) ; 5,48 (1H, dd, $J_{\text{H}2-\text{H}1} = 1,4$ Hz et $J_{\text{H}2-\text{H}3} = 3,4$ Hz, H_2) ; 6,53 (1H, d, $J_{\text{H}1-\text{H}2} = 1,4$ Hz, H_1) ; 9,52 (3H, se, NH, NH_2).

RMN ^{13}C (100 MHz, Acétone- d_6) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,9 ($4\times\text{CH}_3$ acétates) ; 62,5 (C_6) ; 66,1 (C_4) ; 69,7 (C_2) ; 69,8 (C_3) ; 72,4 (C_5) ; 83,1 (C_1) ; 169,4 (C=N thiourée) ; 170,1 ; 170,2 ; 170,4 ; 170,8 ($4\times\text{C}=\text{O}$ acétates).

2,3,4,6-tetra-*O*-acétyl-1-thio- α -D-mannopyrannose **2.41**



Un mélange DCM/ H_2O (1:1, 3 mL) est dégazé à l'aide d'un bullage d'argon de 10 min. De cette solution sont prélevés 2,60 mL, servant à diluer la thiourée glycosylée **2.45** (1 éq, 1,23 mmol, 500 mg). Le potassium bisulfite (1 éq, 1,23 mmol, 274 mg) est ajouté et le tout est chauffé au reflux sous argon pendant 30 min. Après un retour à température ambiante, la phase organique est séparée de la phase aqueuse. Elle est lavée avec de l'eau froide ($3\times 5,00$ mL) puis séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et enfin concentrée. L' α -thiomannose peracétylé **2.41** est obtenu sous forme d'une gomme transparente (0,98 mmol, 356 mg) avec un rendement de 79%.

CCM: $R_f = 0,48$ (AcOEt/Cyclohexane 50:50).

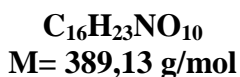
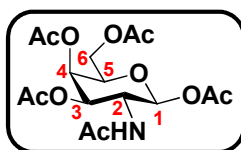
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2923 ; 2850 (ν C_{sp^3} -H) ; 2600 (ν S-H) ; 1746 (ν C=O) ; 1434 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1115 ; 1050 (ν C-O) ; 757 (ν C-S).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,99 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,05 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,10 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,16 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,27 (1H, d, $J_{\text{SH}-\text{H}1} = 6,8$ Hz, SH) ; 4,11

(1H, dd, $J_{H6 \text{ ou } H6'-H5} = 2,1$ Hz et $J_{H6-H6'} = 12,2$ Hz, H₆ ou H_{6'}) ; 4,30 (1H, dd, $J_{H6 \text{ ou } H6'-H5} = 5,0$ Hz et $J_{H6-H6'} = 12,2$ Hz, H₆ ou H_{6'}) ; 4,35 (1H, m, H₅) ; 5,27-5,33 (3H, m, H₂, H₃, H₄) ; 5,55 (1H, dd, $J_{H1-H2} = 0,7$ Hz et $J_{H1-SH} = 6,8$ Hz, H₁).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20,4 ; 20,5 ; 20,6 ; 20,8 (4×CH₃ acétates) ; 62,0 (C₆) ; 66,0 ; 68,4 ; 69,5 ; 71,7 (C₂, C₃, C₄, C₅) ; 76,9 (C₁) ; 169,5 ; 169,7 ; 169,8 ; 170,5 (4×C=O acétates).

2-acétamido-2-déoxy-1,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-β-D-galactopyranoside **2.46**



Une solution contenant le chlorhydrate de la D-galactosamine (1 éq, 1,39 mmol, 301 mg) dissout dans 1,1 mL d'Ac₂O est placée à 0°C. De la pyridine (4,80 mL) est ensuite ajoutée à ce mélange. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 24h. Les excès d'Ac₂O et de pyridine sont éliminés par ajout de 5,00 mL de toluène puis par évaporation sous vide. L'opération est répétée trois fois afin d'obtenir un solide qui est recristallisé dans du MeOH. Au final, le composé **2.46** est obtenu sous forme de solide blanc (1,11 mmol, 432 mg) avec un rendement de 80%.

CCM: R_f = 0,24 (AcOEt).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3262 (ν N-H) ; 2918 (ν C_{sp3}-H) ; 1752 ; 1739 (ν C=O acétates) ; 1645 (ν C=O acétamide) ; 1568 ; 1559 (δ N-H) ; 1374 (δ C-H alkyles) ; 1261 ; 1216 ; 1166 ; 1158 ; 1132 ; 1076 ; 1041 (ν C-O).

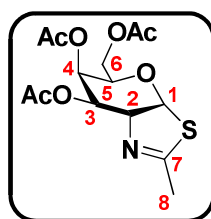
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,94, 2,02, 2,05, 2,13, 2,17 (15H, m, 4×CH₃ acétates, CH₃ acétamide) ; 4,03 (1H, td, $J_{H5-H4} = 1,2$ Hz et $J_{H5-H6/H6'} = 6,8$ Hz, H₅) ; 4,09-4,20 (2H, m, 2H₆) ; 4,45 (1H, dt, $J_{H2-H1/NH} = 8,8$ Hz et $J_{H2-H3} = 11,4$ Hz, H₂) ; 5,08 (1H, dd, $J_{H3-H4} = 3,4$ Hz et $J_{H3-H2} = 11,4$ Hz, H₂) ; 5,36-5,39 (2H, m, H₄, NH acétamide) ; 5,69 (1H, d, $J_{H1-H2} = 8,8$ Hz, H₁).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,7 ; 20,8 ; 20,9 ($4\times\text{CH}_3$ acétates, CH_3 acétamide) ; 62,1 (C_6) ; 65,6 ; 68,4 ; 68,8 (C_2 , C_3 , C_4) ; 70,6 (C_5) ; 90,6 (C_1) ; 168,1 ; 169,6 ; 169,7 ; 170,0 ; 170,6 ($4\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $\text{C}=\text{O}$ acétamide).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 412,1220$; trouvé 412,1209 (2,6 ppm).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*²¹⁹

Thiazoline glycosylée **2.47**



$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_7\text{S}$
M = 345,09 g/mol

Une solution contenant le composé **2.46** (1 éq, 0,93 mmol, 360 mg) et le réactif de Lawesson (0,85 éq, 0,79 mmol, 319 mg), dissouts dans 3,00 mL de toluène, est portée à 80°C sous argon pendant 3h. Après l'ajout de 30 mg de NaHCO_3 , le milieu réactionnel est concentré puis purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/DCM 50:50). Au final, le composé **2.47** est obtenu sous forme d'un huile jaune foncé (0,65 mmol, 223 mg) avec un rendement de 70%.

CCM: $R_f = 0,40$ (DCM/AcOEt 50:50).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 1748 ($\nu \text{ C}=\text{O}$) ; 1630 ($\nu \text{ C}=\text{N}$) ; 1434 ; 1371 ($\delta \text{ C-H}$ alkyles) ; 1226 ; 1153 ; 1123 ; 1078 ; 1044 ($\nu \text{ C-O}$) ; 733 ; 656 ($\nu \text{ C-S}$).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,03 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,06 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,11 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,25 (3H, m, 3H_8) ; 4,07 (1H, dd, $J_{\text{H}6 \text{ ou } \text{H}6'-\text{H}5} = 5,6 \text{ Hz}$ et $J_{\text{H}6-\text{H}6'} = 11,4 \text{ Hz}$, H_6 ou H_6') ; 4,20 (1H, dd, $J_{\text{H}6 \text{ ou } \text{H}6'-\text{H}5} = 7,4 \text{ Hz}$ et $J_{\text{H}6-\text{H}6'} = 11,4 \text{ Hz}$, H_6 ou H_6') ; 4,25-4,29 (1H, m, H_5) ; 4,37 (1H, m, H_2) ; 5,18 (1H, dd, $J_{\text{H}3-\text{H}4} = 3,3 \text{ Hz}$ et $J_{\text{H}3-\text{H}2} = 7,8 \text{ Hz}$, H_3) ; 5,49 (1H, t, $J_{\text{H}4-\text{H}3/\text{H}5} = 3,3 \text{ Hz}$, H_4) ; 6,23 (1H, d, $J_{\text{H}1-\text{H}2} = 6,2 \text{ Hz}$, H_1).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,8 ; 20,9 ; 21,1 ; 21,6 ($3\times\text{CH}_3$ acétates, C_8) ; 61,1 (C_6) ; 66,5 (C_4) ; 70,7 ; 70,8 (C_2 , C_5) ; 74,6 (C_2) ; 89,2 (C_1) ; 168,9 ; 170,0 ; 170,4 ; 170,7 ($3\times\text{C}=\text{O}$ acétates, C_7).

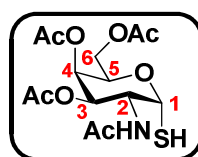
HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[M+H]^+ = 346,0960$; trouvé 346,0952 (2,5 ppm).

HPLC : 6,5 min (H₂O/CH₃CN (0,1% TFA) 20:80).

[α] = +58 (T = 25°C ; c = 0,435 ; CHCl₃).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²²⁰

2-acétamido-2-déoxy-1-thio-3,4,6-tri-O-acétyl- α -D-galactopyranose **2.42**



C₁₄H₂₁NO₈S
M = 363,10 g/mol

Le composé **2.47** (1 éq, 0,45 mmol, 157 mg) est tout d'abord dilué dans 1,5 mL de MeOH anhydre. Ensuite, 123 μ L de TFA et 123 μ L d'H₂O sont ajoutés à ce mélange. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2h. Le milieu est concentré puis purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 96:4) pour donner le composé **2.42** (0,32 mmol, 117 mg) sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 71%.

CCM: R_f = 0,50 (DCM/MeOH 96:4).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 2500 (ν S-H) ; 1746 (ν C=O acétates) ; 1660 ; 1653 (ν C=O acétamide) ; 1558 ; 1539 (δ N-H) ; 1436 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1228 ; 1224 ; 1119 ; 1085 ; 1054 (ν C-O, ν C-N) ; 668 (ν C-S).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,94 (1H, d, $J_{SH-H1} = 6,0$ Hz, SH) ; 1,97 (3H, s, CH₃ acétate) ; 2,00 (3H, s, CH₃ acétate) ; 2,03 (3H, s, CH₃ acétate) ; 2,13 (3H, s, CH₃ acétate) ; 4,02 (1H, dd, $J_{H6 \text{ ou } H6'-H5} = 6,4$ Hz et $J_{H6-H6'} = 11,4$ Hz, H₆ ou H_{6'}) ; 4,14 (1H, dd, $J_{H6 \text{ ou } H6'-H5} = 6,4$ Hz et $J_{H6-H6'} = 11,4$ Hz, H₆ ou H_{6'}) ; 4,52 (1H, td, $J_{H5-H4} = 1,2$ Hz et $J_{H5-H6/H6'} = 6,4$ Hz, H₅) ; 4,69-4,75 (1H, ddd, $J_{H2-H1} = 5,6$ Hz, $J_{H2-NH} = 8,4$ Hz, $J_{H2-H3} = 11,8$ Hz, H₂) ; 5,07 (1H, dd, $J_{H3-H4} = 3,2$ Hz et $J_{H3-H2} = 11,8$ Hz, H₃) ; 5,38 (1H, dd, $J_{H4-H5} = 1,2$ Hz et $J_{H4-H3} = 3,2$ Hz, H₄) ; 5,86 (1H, t, $J_{H1-H2/SH} = 5,6$ Hz, H₁) ; 5,94 (1H, d, $J_{NH-H2} = 8,4$ Hz, NH).

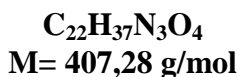
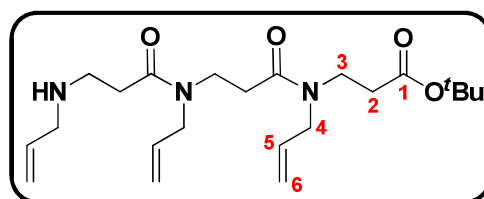
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,8 ; 20,9 ; 23,4 ($3\times\text{CH}_3$ acétates, CH_3 acétamide) ; 48,5 (C_2) ; 61,8 (C_6) ; 67,3 (C_4) ; 67,9 ; 68,0 (C_3 , C_5) ; 79,8 (C_1) ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 171,3 ($3\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $\text{C}=\text{O}$ acétamide).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 364,1061$; trouvé 364,1368.

$[\alpha]$ = +76 ($T = 27^\circ\text{C}$; $c = 0,265$; CHCl_3).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²²⁰

Plateforme β -tripeptoïde **2.43**



1^{ère} addition d'aza-Michaël:

Dans une solution de MeOH anhydre (25 mL), le *tert*-butylacrylate (1 éq, 10,0 mmol, 1,45 mL) est introduit à température ambiante sous argon. L'allylamine (2 éq, 20,0 mmol, 1,5 mL) est ajoutée puis le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 50°C durant toute la nuit. La solution est concentrée et l'amine **2.48** est obtenue sous forme d'un liquide incolore (1,86 g).

1^{ère} réaction d'acylation:

Le produit précédemment synthétisé est dilué dans l'AcOEt (50 mL) sous argon. Le chlorure d'acryloyle (1,2 éq, 12,0 mmol, 0,97 mL) puis la triéthylamine (2,2 éq, 22,0 mmol, 3,06 mL) sont ajoutés. La solution est laissée sous agitation pendant 1h à 0°C . Par la suite, après avoir rajouté de l'AcOEt (30 mL), le tout est filtré et le filtrat récupéré est concentré. L'acrylamide **2.49** est formé sous forme d'une huile jaune orangé (2,37 g).

2^{ème} addition d'aza-Michaël:

Mêmes conditions de réaction que pour la première addition. L'amine **2.50** est obtenue sous forme d'une huile jaune orangé (2,94 g).

2^{ème} réaction d'acylation:

Mêmes conditions de réaction que pour la première acylation. L'acrylamide est obtenu sous forme d'une huile jaune orangé (3,21 g).

3^{ème} addition d'aza-Michaël:

Mêmes conditions de réaction que pour la première addition. La solution est ensuite concentrée et le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 95:5 puis 90:10). La plateforme **2.43** est obtenue sous forme d'une huile orangée (6,50 mmol, 2,65 g) avec un rendement de 65%.

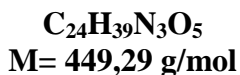
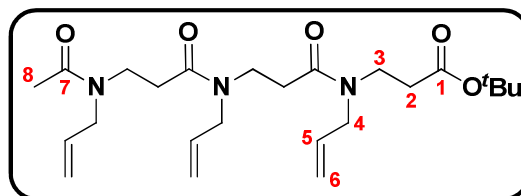
CCM: $R_f = 0,38$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3320 (ν N-H) ; 2980 ; 2840 (ν C_{sp^3} -H) ; 1725 (ν C=O esters de *tert*-butyle) ; 1650 ; 1638 (ν C=O, ν C=C) ; 1472 ; 1456 ; 1417 ; 1394 ; 1368 (δ C-H alkyles) ; 1209 ; 1152 (ν C-O, ν C-N) ; 964 ; 919 (δ C-H alcènes).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,35 ; 1,36 ; 1,37 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 2,38-2,61 (6H, m, 6H_2) ; 2,78-2,92 (3H, m, 2H_3 -NH, NH plateforme β -tripeptotide) ; 3,21 (2H, m, 2H_4 -NH) ; 3,44-3,58 (4H, m, 4H_3) ; 3,90 (4H, m, 4H_4) ; 5,02-5,15 (6H, m, 6H_6) ; 5,61-5,73 (2H, m, 2H_5) ; 5,78-5,87 (1H, m, H_5 -CH₂-NH).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28,1 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 31,7 ; 31,8 ; 31,9 ; 32,0 ; 32,7 ; 32,8 ; 34,0 ; 34,1 ; 34,5 ; 34,8 (3C_2) ; 42,7 ; 42,8 ; 42,9 ; 43,0 ; 43,5 ; 44,7 (3C_3) ; 47,7 ; 47,9 ; 48,2 ; 48,2 ; 51,0 ; 51,3 ; 52,3 ; 52,4 (3C_4) ; 80,7 ; 80,8 ; 81,3 ; 81,5 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 116,6 ; 116,8 ; 117,2 ; 117,3 ; 117,6 (3C_6) ; 132,9 ; 133,0 ; 133,2 ; 133,3 ; 133,4 (2C_5) ; 135,7 ; 135,8 ; 136,0 (C_5 -CH₂-NH) ; 170,0 ; 170,3 ; 170,5 ; 171,0 ; 171,2 ; 171,3 ; 171,5 ; 171,6 ; 171,7 ; 171,8 ($2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptotide, C_1).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 408,2862$; trouvé 408,2843 (4,7 ppm).

Plateforme β -tripeptotide acétylée 2.52

La plateforme β -tripeptotide **2.43** (1 éq, 1,03 mmol, 420 mg) est diluée dans l'AcOEt anhydre (10 mL) à 0°C sous argon. La triéthylamine (2 éq, 2,06 mmol, 288 μ L) puis le chlorure d'acétyle (1,1 éq, 1,14 mmol, 81 μ L) sont ajoutés. Après 3h d'agitation, de l'AcOEt (20 mL) est versé dans la solution. La phase organique est lavée 2 fois avec 10 mL de NaHCO_3 saturé. Les phases aqueuses sont lavées avec de l'AcOEt (10 mL) et toutes les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 puis filtrées. Après concentration, le produit brut acétylé est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/MeOH 95:5). La plateforme β -tripeptotide acétylée **2.52** est obtenue sous forme d'un solide blanc (0,77 mmol, 345 mg) avec un rendement de 74%.

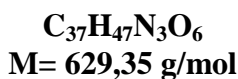
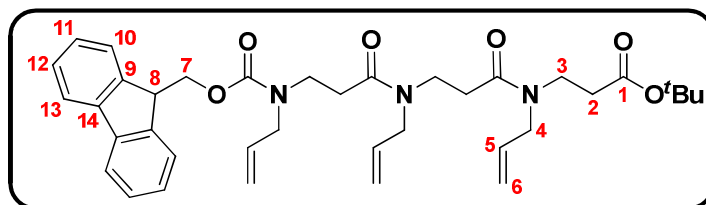
CCM: $R_f = 0,37$ (AcOEt/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2980 ; 2851 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1722 (ν C=O ester de *tert*-butyle) ; 1646 (ν C=O amide) ; 1637 ; 1618 (ν C=C) ; 1480 ; 1436 ; 1406 ; 1391 ; 1366 (δ C-H alkyles) ; 1310 ; 1249 ; 1210 ; 1152 (ν C-O , ν C-N) ; 958 ; 922 (δ C-H alcènes).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 2,15 (3H, s, 3H_8) ; 2,44-2,76 (6H, m, 6H_2) ; 3,5-3,65 (6H, m, 6H_3) ; 3,97 (6H, m, 6H_4) ; 5,08-5,22 (6H, m, 6H_6) ; 5,68-5,81 (3H, m, 3H_5).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 21,5 (C_8) ; 28,1 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 31,6 ; 31,7 ; 31,8 ; 32,1 ; 32,2 ; 34,1 ; 34,6 ; 34,8 (3C_2) ; 42,7 ; 42,8 ; 42,9 ; 43,0 ; 43,5 ; 43,6 ; 43,8 ; 44,4 ; 44,5 (3C_3) ; 47,7 ; 47,8 ; 47,9 ; 48,0 ; 48,1 ; 48,3 ; 48,4 ; 51,0 ; 51,3 ; 51,4 ; 52,2 ; 52,3 (3C_4) ; 80,7 ; 81,3 ($\text{C-(CH}_3)_3$) ; 116,4 ; 116,5 ; 116,6 ; 116,7 ; 117,2 ; 117,3 ; 117,5 ; 117,6 (3C_6) ; 133,0 ; 133,1 ; 133,2 ; 133,3 ; 133,4 ; 133,5 (3C_5) ; 170,3 ; 170,4 ; 170,6 ; 170,8 ; 171,0 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,3 ; 171,4 ; 171,5 ; 171,7 ; 171,8 ($2\times\text{C=O}$ plateforme peptotide, C_1 , C_7).

Point de fusion : 91°C.

Plateforme β -tripeptoïde 2.54

La plateforme β -tripeptoïde protégée par un Fmoc **2.54** est obtenue en appliquant la procédure générale de protection d'amine par un Fmoc, en utilisant:

- Plateforme β -tripeptoïde **2.43** (1 éq, 0,98 mmol, 400 mg)
- FmocCl (1 éq, 0,98 mmol, 254 mg)
- NaHCO_3 (5,40 mL)
- 1,4-dioxane (3,50 mL)

Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: AcOEt/Cyclohexane 50:50, 70:30 puis 100:0). Le composé **2.54** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (0,73 mmol, 459 mg) avec un rendement de 74%.

CCM: $R_f = 0,76$ (AcOEt).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2982 ; 2859 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1724 (ν C=O ester de *tert*-butyle) ; 1685 ; 1644 ; 1630 (ν C=O amide et carbamate, ν C=C) ; 1474 ; 1440 ; 1406 ; 1378 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1318 ; 1244 ; 1208 ; 1171 ; 1157 ; 1148 (ν C-O , ν C-N) ; 962 ; 946 (δ C-H alcènes).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,40, 1,41, 1,42, 1,43 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 2,22-2,73 (6H, s, 6H_2) ; 3,30-3,64 (6H, m, 6H_3) ; 3,80-4,00 (6H, m, 6H_4) ; 4,20 (1H, m, H_8) ; 4,45 (2H, m, 2H_7) ; 5,00-5,18 (6H, m, 6H_6) ; 5,58-5,78 (3H, m, 3H_5) ; 7,28 (2H, t, $J_{\text{H}11-\text{H}10/\text{H}12} = 7,4 \text{ Hz}$, 2H_{11}) ; 7,37 (2H, t, $J_{\text{H}12-\text{H}11/\text{H}13} = 7,5 \text{ Hz}$, 2H_{12}) ; 7,55 (2H, d, $J_{\text{H}10-\text{H}11} = 7,3 \text{ Hz}$, 2H_{10}) ; 7,73 (2H, d, $J_{\text{H}13-\text{H}12} = 7,4 \text{ Hz}$, 2H_{13}).

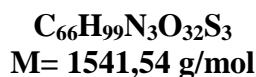
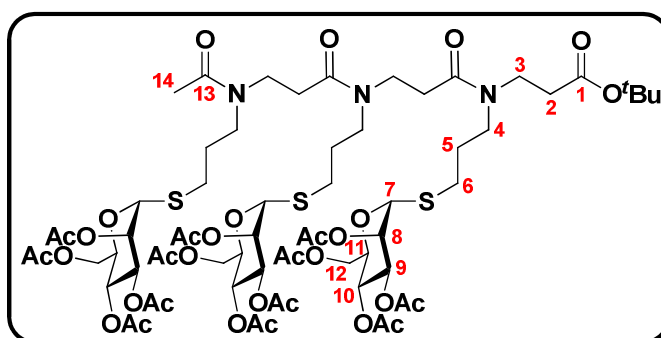
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 28,2 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 31,7 ; 31,8 ; 31,9 ; 32,2 ; 34,2 ; 34,5 ; 34,6 ; 34,8 (3C_2) ; 42,8 ; 43,1 ; 43,6 ; 44,3 ; 44,4 (3C_3) ; 47,5 (C_8) ; 47,8 ; 48,0 ; 48,3 ; 48,4 ; 50,5 ; 50,6 ; 50,7 ; 51,1 ; 51,3 ; 51,4 (3C_4) ; 67,1 ; 67,3 (C_7) ; 80,8 ; 80,9 ; 81,4

(C-(CH₃)₃) ; 116,5 ; 116,6 ; 116,7 ; 117,1 ; 117,3 ; 117,4 ; 117,5 ; 117,6 (3C₆) ; 120,1 (2C₁₃) ; 124,9 ; 125,1 (2C₁₀) ; 127,1 ; 127,2 (2C₁₁) ; 127,8 (2C₁₂) ; 133,0 ; 133,1 ; 133,2 ; 133,3 ; 133,4 ; 133,5 ; 133,6 (3C₅) ; 141,5 ; 144,1 (C₉, C₁₄) ; 156,1 (C=O carbamate) ; 170,4 ; 170,6 ; 171,1 ; 171,4 ; 171,6 ; 171,7 ; 171,8 (2×C=O plateforme peptoides, C₁).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 652,3363 ; trouvé 652,3370 (1,1 ppm) ; m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 630,3538 ; trouvé 630,3578 (6,3 ppm).

Point de fusion : 103°C.

Plateforme β-tripeptoides acétylée S-Man 2.53



Une solution contenant la plateforme β-tripeptoides **2.52** (1 éq, 0,11 mmol, 50 mg), l'α-thiomannose peracétylé **2.41** (3,6 éq, 0,40 mmol, 146 mg) et le DPAP (0,36 éq, 0,04 mmol - 10% molaire par rapport au sucre **2.41**, 10,3 mg) dans 2,40 mL de DCM, est placée dans un tube Pyrex. Le tube est attaché à une lampe Hg de moyenne pression, équipée avec un filtre Pyrex thermostaté à l'aide d'une circulation d'eau. Le milieu réactionnel est irradié pendant 3h avec un bullage d'argon, à température ambiante. Après concentration du milieu, le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/MeOH 97:3). La molécule attendue **2.53** est obtenue sous forme d'une huile jaune orangé (0,094 mmol, 146 mg) avec un rendement de 85%.

CCM: R_f = 0,49 (DCM/MeOH 95:5).

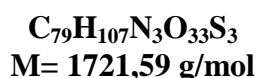
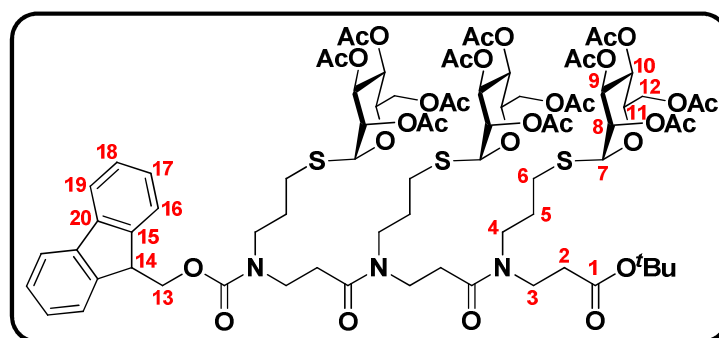
IR (ATR) ν (cm⁻¹): 2927 ; 2853 (ν C_{sp3}-H) ; 1747 (ν C=O esters) ; 1641 (ν C=O amides) ; 1428 ; 1423 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1153 ; 1104 ; 1050 (ν C-O, ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,37 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,75-1,87 (6H, s, 6H_5) ; 1,91 (9H, s, CH_3 acétate) ; 1,96 (3H, m, 3H_{14}) ; 1,98 (9H, s, CH_3 acétate) ; 2,02 (9H, s, CH_3 acétate) ; 2,09 (9H, s, CH_3 acétate) ; 2,39-2,64 (12H, m, 6H_2 , 6H_6) ; 3,29-3,93 (12H, m, 6H_3 , 6H_4) ; 4,07-4,25 (9H, m, 3H_{11} , 6H_{12}) ; 5,03-5,27 (12H, m, 3H_7 , 3H_8 , 3H_9 , 3H_{10}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ; 20,9 ; 21,0 ($12\times\text{CH}_3$ acétates ; C_{14}) ; 27,4 ; 27,5 ; 28,1 ; 28,2 ; 28,5 ; 28,6 ; 28,8 ; 29,7 ; 31,3 ; 31,4 ; 31,5 ; 31,8 ; 32,0 ; 32,1 ; 32,2 ; 33,9 ; 34,1 ; 34,1 ; 34,7 ; 34,8 ; 35,0 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, 3C_2 , 3C_5 , 3C_6) ; 42,4 ; 42,7 ; 43,0 ; 43,6 ; 43,7 ; 44,5 ; 44,6 ; 44,8 ; 44,9 ; 47,3 ; 47,5 ; 47,6 ; 47,9 ; 48,0 ; 48,1 ; 48,3 ; 48,4 ; 51,0 ; 51,3 ; 52,1 ; 52,2 ; 52,3 (3C_3 , 3C_4) ; 62,4 (3C_{12}) ; 66,1 ; 66,2 ; 69,1 ; 69,2 ; 69,3 ; 69,4 ; 69,5 ; 70,7 ; 71,1 ; 71,2 (3C_8 , 3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11}) ; 80,8 ; 81,5 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 82,4 ; 82,5 (3C_7) ; 169,7 ; 169,8 ; 169,9 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,8 ; 171,1 ; 171,2 ($2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptoïde, C_1 , C_{13}).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}/2 = 793,7585$; trouvé 793,7599 (1,76 ppm).

Plateforme β -tripeptoïde S-Man 2.55



Une solution contenant la plateforme β -tripeptoïde **2.54** (1 éq, 0,12 mmol, 72,6 mg), l' α -thiomannose peracétylé **2.41** (3,6 éq, 0,42 mmol, 151 mg) et le DPAP (0,72 éq, 0,08 mmol - 20% molaire par rapport au sucre **2.41**, 21,2 mg) dans 2,40 mL de DCM, est placée dans un tube Pyrex. Le tube est attaché à une lampe Hg de moyenne pression, équipée avec un filtre Pyrex thermostaté à l'aide d'une circulation d'eau. Le milieu réactionnel est irradié pendant 7h avec un bullage d'argon, à température ambiante. Après concentration du milieu, le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane 90:10). La molécule

attendue **2.55** est obtenue sous forme d'une huile jaune pâle (0,06 mmol, 103 mg) avec un rendement de 50%.

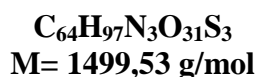
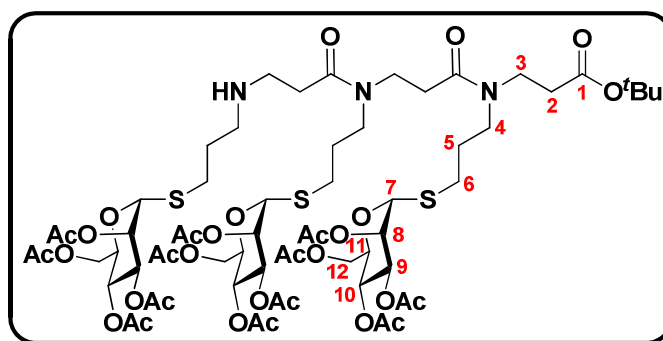
CCM: $R_f = 0,29$ (AcOEt/Cyclohexane 90:10).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2933 ; 2926 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1748 ; 1718 (ν C=O esters) ; 1695 ; 1685 ; 1641 ; 1636 (ν C=O amides et carbamate, ν C=C) ; 1473 ; 1448 ; 1424 ; 1420 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1224 ; 1153 ; 1104 ; 1064 ; 1050 (ν C-O , ν C-N) ; 915 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,38-1,40 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,46-1,88 (6H, s, 6H_5) ; 1,91-2,15 (36H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétate) ; 2,16-2,67 (12H, m, 6H_2 , 6H_6) ; 2,96-3,58 (12H, m, 6H_3 , 6H_4) ; 3,97-4,10 (3H, m, 3H_{12}) ; 4,18 (1H, m, H_{14}) ; 4,22-4,38 (6H, m, 3H_{11} , 3H_{12}) ; 4,48 (2H, m, 2H_{13}) ; 5,14-5,30 (12H, m, 3H_7 , 3H_8 , 3H_9 , 3H_{10}) ; 7,28 (2H, t, $J_{\text{H}17\text{-H}16/\text{H}18} = 7,2$ Hz, 2H_{17}) ; 7,35 (2H, t, $J_{\text{H}18\text{-H}17/\text{H}19} = 7,2$ Hz, 2H_{18}) ; 7,53 (2H, d, $J_{\text{H}16\text{-H}17} = 7,2$ Hz, 2H_{16}) ; 7,72 (2H, d, $J_{\text{H}19\text{-H}18} = 7,2$ Hz, 2H_{19}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,7 ; 20,8 ; 20,9 ; 21,0 ($12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,2 ; 27,3 ; 27,4 ; 27,5 ; 28,2 ; 28,4 ; 28,5 ; 28,6 ; 28,7 ; 28,8 ; 29,7 ; 31,5 ; 31,6 ; 31,8 ; 32,0 ; 32,2 ; 33,9 ; 34,8 ; 35,0 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, 3C_2 , 3C_5 , 3C_6) ; 42,4 ; 43,0 ; 43,2 ; 43,4 ; 43,6 ; 43,7 ; 44,6 ; 44,7 ; 44,8 ; 47,0 ; 47,3 ; 47,5 ; 47,6 (3C_3 ; 3C_4) ; 62,4 (3C_{12}) ; 66,2 ; 66,3 ; 66,6 ; 66,6 ; 67,7 ; 69,1 ; 69,3 ; 69,5 ; 71,0 ; 71,1 (3C_8 , 3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11} , C_{14}) ; 80,8 ; 80,9 ; 81,5 ; 81,6 ; 81,7 ($\text{C-(CH}_3)_3$) ; 82,4 ; 82,5 ; 82,6 ; 82,7 (3C_7) ; 120,1 (2C_{19}) ; 124,8 ; 124,9 (2C_{16}) ; 127,2 (2C_{17}) ; 127,8 (2C_{18}) ; 141,5 ; 144,1 (2C_{15} , 2C_{20}) ; 155,9 ; 156,0 (C=O carbamate) ; 169,7 ; 169,8 ; 170,0 ; 170,3 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,9 ; 171,0 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,3 ($12\times\text{C=O}$ acétates, $2\times\text{C=O}$ plateforme peptidique, C_1).

HRMS (TOF MS ES^+): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}/2 = 883,7872$; trouvé 883,7897 (2,83 ppm).

Plateforme β -tripeptoïde *S*-Man 2.51

La synthèse de la plateforme β -tripeptoïde *S*-mannosylée **2.51** consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'amine protégée par un Fmoc, en utilisant:

- Le composé **2.55** (1 éq, 0,019 mmol, 32,8 mg)
- Et_2NH (0,23 mL)
- CH_3CN (0,51 mL)

Après traitement du milieu (détailé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 97:3 puis 95:5), l'amine **2.51** est obtenue sous forme d'une huile jaune pâle (0,014 mmol, 22 mg) avec un rendement de 73%.

CCM: $R_f = 0,35$ (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2957 ; 2924 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1746 (ν C=O esters) ; 1640 (ν C=O amides) ; 1458 ; 1434 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1154 ; 1101 ; 1049 (ν C-O , ν C-N).

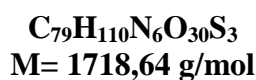
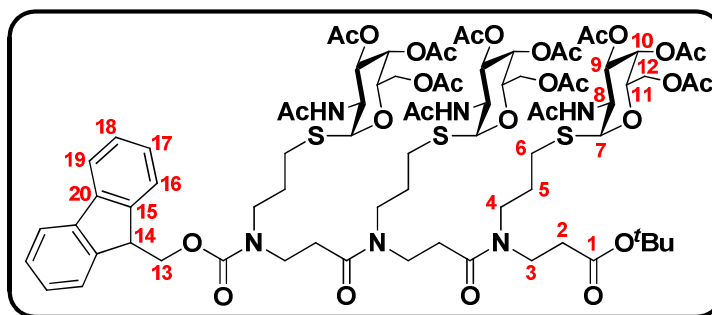
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,80-2,18 (42H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates, 6H₅) ; 2,45-2,82 (12H, m, 6H₂, 6H₆) ; 2,93-3,06 (5H, m, 2H₃, 2H₄, NH) ; 3,40-3,56 (8H, m, 4H₃, 4H₄) ; 4,04-4,14 (3H, m, 3H₁₂) ; 4,25-4,39 (6H, m, 3H₁₁, 3H₁₂) ; 5,19-5,35 (12H, m, 3H₇, 3H₈, 3H₉, 3H₁₀).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,8 ; 20,9 ; 21,0 ; 21,2 ($12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,4 ; 27,5 ; 28,3 ; 28,7 ; 28,9 ; 29,9 ; 31,7 ; 34,1 ; 36,4 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, 3C₂, 3C₅, 3C₆) ; 44,6 ; 44,9 ; 45,0 ; 45,1 ; 45,2 ; 45,3 ; 46,0 ; 46,2 ; 47,5 ; 49,8 (3C₃, 3C₄) ; 62,6 ; 62,7 (3C₁₂) ; 66,3 ; 66,5 ; 69,2 ; 69,3 ; 69,4 ; 69,7 ; 71,1 ; 71,2 ; 71,3 ; 71,4 (3C₈, 3C₉, 3C₁₀, 3C₁₁) ; 80,5 ; 80,8 (C-

(CH₃)₃) ; 82,4 ; 82,5 ; 82,6 ; 82,7 ; 82,8 (3C₇) ; 169,9 ; 170,0 ; 170,2 ; 170,3 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,8 ; 170,9 (12×C=O acétates, 2×C=O plateforme peptoidé, C₁).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+H]²⁺/2 = 750,7707 ; trouvé 750,8103 ; m/z calculé pour [M+H+Na]²⁺/2 = 761,7617 ; trouvé 761,7992.

Plateforme β-tripeptoidé S-GalNAc 2.56



Une solution contenant la plateforme β-tripeptoidé **2.54** (1 éq, 0,12 mmol, 77 mg), l'α-thiomannose peracétylé **2.42** (3,6 éq, 0,44 mmol, 160 mg) et le DPAP (1,08 éq, 0,13 mmol - 30% molaire par rapport au sucre **2.42**, 34 mg) dans 2,20 mL de DCM, est placée dans un tube Pyrex. Le tube est attaché à une lampe Hg de moyenne pression, équipée avec un filtre Pyrex thermostaté à l'aide d'une circulation d'eau. Le milieu réactionnel est irradié pendant 7h avec un bullage d'argon, à température ambiante. Après concentration du milieu, le produit brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (gradient DCM/MeOH 97:3 puis 95:5). La molécule attendue **2.56** est obtenue sous forme d'une mousse blanche (0,067 mmol, 115 mg) avec un rendement de 55%.

CCM: R_f = 0,51 (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 2931 (ν C_{sp3}-H) ; 1748 ; 1731 (ν C=O esters) ; 1672 ; 1650 ; 1643 ; 1540 (ν C=O amides et carbamate, ν C=C) ; 1430 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1229 ; 1154 ; 1114 ; 1083 ; 1047 (ν C-O, ν C-N) ; 978 (δ C-H aromatiques).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,38-1,40 (9H, m, 3×CH₃ ester de *tert*-butyle) ; 1,72-1,90 (6H, s, 6H₅) ; 1,94-2,16 (36H, m, 9×CH₃ acétates, 3×CH₃ acétamides) ; 2,21-2,76 (12H, m, 6H₂, 6H₆) ; 3,18-3,61 (12H, m, 6H₃, 6H₄) ; 3,97-4,24 (7H, m, 6H₁₂, H₁₄) ; 4,42-4,57 (5H, m, 3H₁₁,

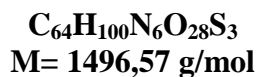
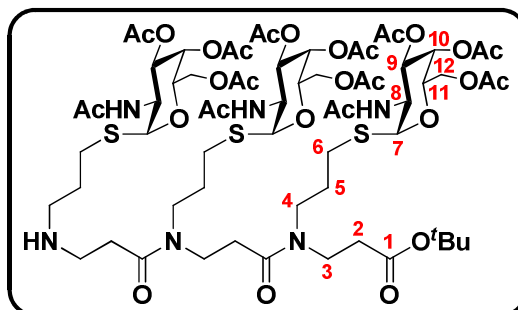
2H_{13}) ; 4,66-4,78 (3H, m, 3H_8) ; 4,93-5,05 (3H, m, 3H_9) ; 5,35 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,42-5,58 (3H, m, 3H_7) ; 5,90-6,78 (3H, m, $3\times\text{NH}$ acétamides) ; 7,29 (2H, m, 2H_{17}) ; 7,37 (2H, m, 2H_{18}) ; 7,54 (2H, d, $J_{\text{H}16-\text{H}17} = 7,2$ Hz, 2H_{16}) ; 7,73 (2H, d, $J_{\text{H}19-\text{H}18} = 7,5$ Hz, 2H_{19}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,9 ; 23,3 ; 23,4 ($9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 27,6 ; 27,7 ; 27,8 ; 27,9 ; 28,0 ; 28,2 ; 28,6 ; 28,7 ; 28,8 ; 29,0 ; 29,9 ; 31,9 ; 32,1 ; 32,2 ; 32,3 ; 32,4 ; 32,6 ; 34,0 ; 34,9 ; 35,0 ($3\times\text{CH}_3$ ester de tertbutyle, 3C_2 , 3C_5 , 3C_6) ; 41,9 ; 43,7 ; 44,8 ; 45,0 ; 45,1 ; 47,2 ; 47,4 ; 47,5 ; 48,4 (3C_3 , 3C_4 , 3C_8 , C_{15}) ; 61,9 ; 62,0 (3C_{12}) ; 67,4 ; 67,5 ; 68,4 ; 68,5 ; 68,6 (3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11} , C_{14}) ; 81,0 ; 81,1 ; 81,6 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 84,9 ; 85,0 ; 85,1 ; 85,3 ; 85,5 ; 85,6 (3C_7) ; 120,2 (2C_{19}) ; 124,8 (2C_{16}) ; 127,3 (2C_{17}) ; 127,9 (2C_{18}) ; 141,6 ; 144,1 (2C_{15} , 2C_{20}) ; 156,0 ; 156,1 ($\text{C}=\text{O}$ carbamate) ; 170,5 ; 170,6 ; 171,0 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,3 ($9\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $3\times\text{C}=\text{O}$ acétamides, $2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptidique, C_1).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 860,3293$; trouvé 860,3246 (5,46 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}/2 = 871,3196$; trouvé 871,3153 (4,9 ppm).

$[\alpha] = +277$ ($T = 25^\circ\text{C}$; $c = 0,10$; CHCl_3).

Plateforme β -tripeptidique *S*-GalNAc **2.57**



La synthèse de la plateforme β -tripeptidique *S*-GalNAc **2.57** consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'amine protégée par un Fmoc, en utilisant:

- Le composé **2.56** (1 éq, 0,024 mmol, 41 mg)
- Et_2NH (0,30 mL)
- CH_3CN (0,64 mL)

Après traitement du milieu (détailé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 95:5 puis 90:10), l'amine **2.57** est obtenue sous forme d'une huile jaune pâle (0,017 mmol, 25 mg) avec un rendement de 70%.

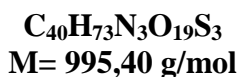
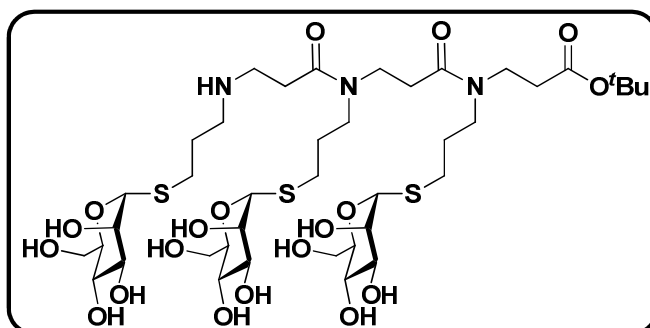
CCM: $R_f = 0,58$ (DCM/MeOH 90:10).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2927 ; 2849 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1746 (ν C=O esters) ; 1672 (ν C=O amides) ; 1460 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1232 ; 1225 ; 1220 ; 1151 ; 1099 ; 1039 (ν C-O , ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,74-2,26 (43H, m, 6H_5 , $9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides, NH) ; 2,30-2,90 (12H, m, 6H_2 , 6H_6) ; 3,05-3,72 (12H, m, 6H_3 , 6H_4) ; 4,03-4,32 (6H, m, 6H_{12}) ; 4,55 (3H, m, 3H_{11}) ; 4,62-4,79 (3H, m, 3H_8) ; 5,00-5,11 (3H, m, 3H_9) ; 5,31-5,50 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,51-5,72 (3H, m, 3H_7).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1497,5820$; trouvé 1497,5752 (4,5 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 749,2947$; trouvé 749,2899 (6,4 ppm).

Plateforme β -tripeptotide S-Man(OH) **2.58**



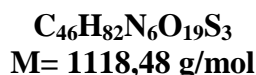
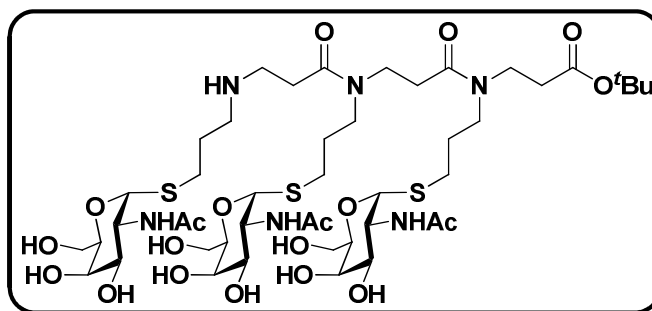
Une solution contenant la plateforme β -tripeptotide *O*-mannosylée **2.51** (1 éq, 0,0094 mmol, 14,1 mg) diluée dans 2,50 mL de MeOH anhydre, est traitée par 0,25 mL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH= 8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+). La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **2.58** sous forme de solide blanc (0,0094 mmol, 9,4 mg) de manière quantitative.

CCM: $R_f = 0,31$ (Propanol/ H_2O 70:30).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3512-3200 (ν N-H, O-H) ; 2926 ; 2858 (ν C_{sp^3} -H) ; 1711 ; 1653 ; 1645 ; 1628 (ν C=O ester et amides) ; 1555 ; 1473 (δ N-H) ; 1345 (δ C-H alkyles) ; 1233 ; 1154 ; 1128 ; 1055 ; 1038 (ν C-O, ν C-N).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 996,4073$; trouvé 996,4085 (1,2 ppm).

Plateforme β -tripeptoïde S-GalNAc(OH) **2.59**



Une solution contenant la plateforme β -tripeptoïde O-GalNAc **2.57** (1 éq, 0,011 mmol, 16,3 mg) diluée dans 2,90 mL de MeOH anhydre, est traitée par 0,50 mL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH= 8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+). La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **2.59** sous forme de solide blanc (0,011 mmol, 12,2 mg) de manière quantitative.

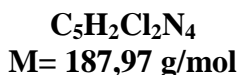
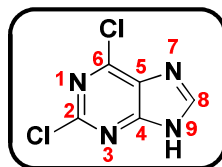
CCM: $R_f = 0,25$ (Propanol/ H_2O 70:30).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3555-3212 (ν N-H, O-H) ; 2926 ; 2880 (ν C_{sp^3} -H) ; 1715 ; 1653 ; 1644 ; 1628 (ν C=O ester et amides) ; 1555 ; 1478 (δ N-H) ; 1345 (δ C-H alkyles) ; 1233 ; 1155 ; 1130 ; 1055 ; 1038 (ν C-O, ν C-N).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1119,4870$; trouvé 1119,4895 (2,2 ppm).

D. Procédures expérimentales du chapitre III

2,6-dichloropurine 3.1



Une solution contenant POCl₃ (10 éq, 401 mmol, 37,5 mL) et de la xanthine (1 éq, 40 mmol, 6,08 g) est placée sous argon à 50°C. De la DBU est ajoutée (6 éq, 239 mmol, 35,8 mL) et le milieu réactionnel est porté au reflux sous argon pendant 16h. Après être revenue à température ambiante, la solution est versée dans un mélange eau + glace (300 g) sous une forte agitation. Le pH est amené à 4 à l'aide d'une solution aqueuse de NaOH à 50% puis le mélange est filtré sur célite. Le milieu est extrait avec de l'AcOEt (3×250 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées, filtrées et concentrées. Le solide jaune obtenu est dissout dans 80 mL de MeOH et du charbon actif (0,30 g) est ajouté. L'ensemble est porté à ébullition. Après filtration sur célite, le filtrat est légèrement concentré. Le produit chloré **3.1** précipite et est récupéré sous forme d'un solide blanc (25,0 mmol, 4,69 g) avec un rendement de 62%.

CCM: R_f = 0,22 (AcOEt/Cyclohexane 70:30).

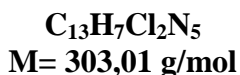
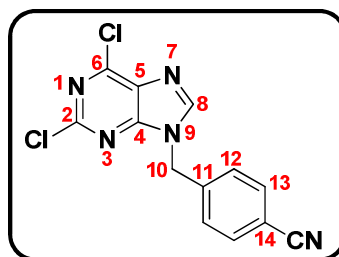
IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3125 (ν N-H) ; 1619 ; 1568 (ν C=C et C=N) ; 1355 ; 1246 (ν C-N) ; 1017 (ν C-Cl aromatique) ; 876 (δ C-H aromatique).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8,70 (1H, s, H₈).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 127,5 (C₅) ; 146,5 (C₈) ; 147,0 (C₆) ; 149,7 (C₂) ; 155,2 (C₄).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour [M+H]⁺ = 188,9735 ; trouvé 188,9729 (3,18 ppm) ; m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 210,9554 ; trouvé 210,9566 (5,69 ppm).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²³⁶

4-(2,6-dichloropurine-9-ylméthyle) benzonitrile **3.2**

L'hétérocycle **3.1** (1 éq, 18,3 mmol, 3,45 g) est introduit dans une solution de K_2CO_3 (3,13 éq, 57,3 mmol, 7,93 g) dans du DMF (58 mL). Le (4-bromométhyle) benzonitrile (1,38 éq, 25,0 mmol, 4,95 g) est ajouté à cette solution. Le milieu réactionnel est laissé à température ambiante pendant 22h. Après filtration, de l'eau distillée (1,70 L) est ajoutée et le milieu est extrait avec de l'AcOEt (2×450 mL et 1×250 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis concentrée. Le résidu orangé qui en découle est dilué dans du MeOH (60 mL) afin de faire précipiter le milieu (NB: le filtrat récupéré est traité de la même manière que précédemment). Au final, après filtration, le composé **3.2** est obtenu sous forme d'un solide jaune clair (10,4 mmol, 3,17 g) avec un rendement est de 57%.

CCM: $R_f = 0,36$ (AcOEt/Cyclohexane 70:30).

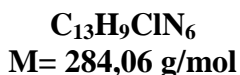
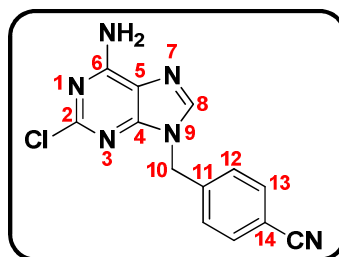
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3100 (ν N-H) ; 2229 (ν $\text{C}\equiv\text{N}$) ; 1588 ; 1553 ; 1450 (ν $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{N}$) ; 1354 ; 1224 (ν $\text{C}-\text{N}$) ; 1160 ; 1130 (ν $\text{C}-\text{Cl}$ aromatique) ; 830 (δ $\text{C}-\text{H}$ aromatique).

RMN ^1H (400 MHz, Acétone- d_6) δ (ppm): 5,73 (2H, s, 2H_{10}) ; 7,62 (2H, d, $J(\text{ortho})_{\text{H}_{12}-\text{H}_{13}} = 8,3 \text{ Hz}$, 2H_{12}) ; 7,79 (2H, d, $J(\text{ortho})_{\text{H}_{13}-\text{H}_{12}} = 8,3 \text{ Hz}$, 2H_{13}) ; 8,68 (1H, s, H_8).

RMN ^{13}C (100 MHz, Acétone- d_6) δ (ppm): 46,9 (C_{10}) ; 112,0 (C_{14}) ; 118,0 ($\text{C}\equiv\text{N}$) ; 127,6 (C_5) ; 128,7 (2C_{12}) ; 132,6 (2C_{13}) ; 141,0 (C_{11}) ; 147,5 (C_8) ; 150,6 ; 152,1 (C_2 et C_6) ; 154,0 (C_4).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 325,9976$; trouvé 325,9979 (0,92 ppm).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²³³

4-(6-amino-2-chloropurine-9-ylméthyl) benzonitrile 3.3

Le composé **3.2** (6,73 mmol, 2,05 g) est dilué dans une solution de MeOH-NH₃ (8 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 60°C dans un autoclave pendant 18h. Le mélange biphasique (solide + liquide) est refroidi à 0°C. Après filtration, le composé désiré **3.3** est obtenu sous forme d'un solide blanc (5,29 mmol, 1,50 g) avec un rendement de 79%.

CCM: R_f = 0,30 (DCM/MeOH 95:5).

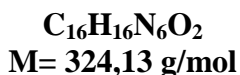
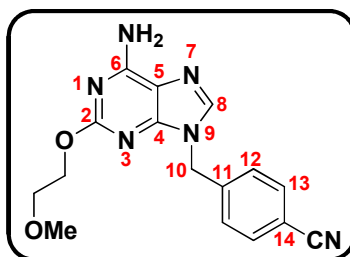
IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3340 ; 3150 ; 3117 (ν N-H et C_{sp2}-H) ; 2236 (ν C≡N) ; 1653 ; 1595 ; 1576 (ν C=C et C=N) ; 1310 ; 1302 ; 1244 (ν C-N) ; 1164 ; 1039 (ν C-Cl aromatique) ; 929 ; 812 (δ C-H aromatique).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 5,45 (2H, s, 2H₁₀) ; 7,41 (2H, d, J_{H12-H13} = 8,3 Hz, 2H₁₂) ; 7,83 (2H, d, J_{H13-H12} = 8,3 Hz, 2H₁₃) ; 8,27 (1H, s, H₈).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 44,9 (C₁₀) ; 109,6 (C₁₄) ; 116,8 ; 117,5 (C≡N, C₅) ; 127,1 (2C₁₂) ; 137,7 (2C₁₃) ; 140,5 ; 141,2 (C₈, C₁₁) ; 149,5 ; 152,2 ; 155,8 (C₂, C₄, C₆).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour [M+H]⁺ = 285,0655 ; trouvé 285,0656 (0,04 ppm) ; m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 307,0475 ; trouvé 307,0492 (5,54 ppm).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²³³

4-[6-amino-2-(2-méthoxyéthoxy) purine-9-ylméthyl] benzonitrile 3.4

Du sodium (2 éq, 7,74 mmol, 178 mg) est additionné au 2-méthoxyéthanol (33 mL) sous argon. Une solution contenant l'hétérocycle **3.3** (1 éq, 3,87 mmol, 1,10 g) dissout dans le 2-méthoxyéthanol (330 mL), est ajoutée à la première solution. Le milieu réactionnel est chauffé à 120°C sous argon pendant 17h. Après concentration du milieu, le résidu rouge foncé obtenu est solubilisé dans de l'eau et de l'AcOEt (un minimum de 350 mL pour chaque solvant). L'ensemble est extrait avec de l'AcOEt (3×250 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées, filtrées puis concentrées. Le résidu orangé brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (dépôt solide, éluant : DCM/MeOH 95:5). Le composé **3.4** est obtenu sous forme d'un solide blanc (2,77 mmol, 900 mg) avec un rendement de 72%.

CCM: $R_f = 0,2$ (DCM/MeOH 95:5).

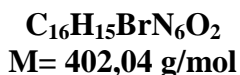
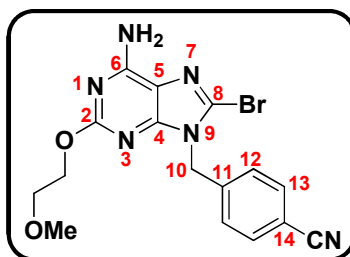
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3339 ; 3310 ; 3146 (ν N-H, C_{sp^2} -H) ; 2231 (ν $\text{C}\equiv\text{N}$) ; 1666 ; 1611 ; 1588 ; 1491 (ν $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{N}$) ; 1384 (δ C-H alkyles) ; 1351 ; 1333 ; 1277 ; 1114 ; 1071 (ν C-N et C-O) ; 943 ; 835 ; 790 (δ C-H aromatique).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,26 (3H, s, CH_3 -O) ; 3,58 (2H, t, $J = 4,7$ Hz, CH_2 -O) ; 4,29 (2H, t, $J = 4,7$ Hz, CH_2 -O) ; 5,37 (2H, s, 2H_{10}) ; 7,27 (2H, s, NH_2) ; 7,45 (2H, d, $J(\text{ortho})_{\text{H}_{12}-\text{H}_{13}} = 8,2$ Hz, 2H_{12}) ; 7,82 (2H, d, $J(\text{ortho})_{\text{H}_{13}-\text{H}_{12}} = 8,2$ Hz, 2H_{13}) ; 8,07 (1H, s, H_8).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 44,6 (C_{10}) ; 57,0 (CH_3 -O) ; 64,3 (CH_2 -O) ; 69,2 (CH_2 -O) ; 109,4 (C_{14}) ; 114,1 ; 117,6 ($\text{C}\equiv\text{N}$, C_5) ; 127,4 (2C_{12}) ; 131,6 (2C_{13}) ; 138,4 ; 141,6 (C_8 , C_{11}) ; 150,1 ; 155,8 ; 160,3 (C_2 , C_4 , C_6).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 325,1413$; trouvé 325,1406 (2,1 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 347,1232$; trouvé 347,1219 (3,7 ppm).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*²³³

4-[6-amino-8-bromo-2-(2-méthoxyéthoxy) purine-9-ylméthyl] benzonitrile 3.5

Du Br_2 (64 éq, 148 mmol, 7,46 mL) est ajouté à une solution contenant l'hétérocycle **3.4** (1 éq, 2,30 mmol, 746,7 mg) dilué dans du DCM (220 mL). Le milieu réactionnel est placé à température ambiante sous agitation pendant 24h. Celui-ci est dilué avec du DCM puis lavé avec une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,2 M, 750 mL) ainsi qu'avec une solution saturée en NaHCO_3 (500 mL et 130 mL). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis concentrée. Le résidu jaune clair obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (dépôt solide, éluant : CH_2Cl_2 , MeOH 97:3). Le composé désiré **3.5** est obtenu sous forme d'un solide blanc (1,65 mmol, 666,4 mg) avec un rendement de 73%.

CCM: $R_f = 0,29$ (DCM/MeOH 97:3).

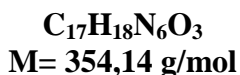
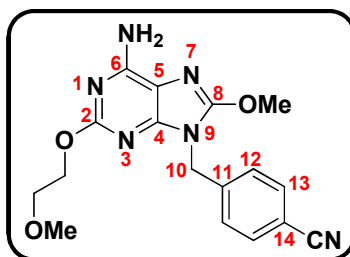
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3322 (ν N-H) ; 2226 (ν $\text{C}\equiv\text{N}$) ; 1636 ; 1591 (ν $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{N}$) ; 1402 ; 1393 (δ C-H alkyles) ; 1336 ; 1322 ; 1167 ; 1112 (ν C-N et C-O) ; 945 ; 826 ; 767 (δ C-H aromatiques) ; 685 (ν C-Br).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,26 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-O}$) ; 3,59 (2H, t, $J = 4,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 4,30 (2H, t, $J = 4,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 5,35 (2H, s, 2H_{10}) ; 7,39 (2H, d, $J(\text{ortho})_{\text{H}_{12}\text{-H}_{13}} = 8,2$ Hz, 2H_{12}) ; 7,48 (2H, s, NH_2) ; 7,83 (2H, d, $J(\text{ortho})_{\text{H}_{13}\text{-H}_{12}} = 8,2$ Hz, 2H_{13}).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 45,0 (C_{10}) ; 57,1 ($\text{CH}_3\text{-O}$) ; 64,5 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 69,2 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 109,6 (C_{14}) ; 114,4 ; 117,5 ($\text{C}\equiv\text{N}$, C_5) ; 122,7 (C_8) ; 127 (2C_{12}) ; 131,7 (2C_{13}) ; 140,5 (C_{11}) ; 151,4 ; 154,7 ; 160,4 (C_2 , C_4 , C_6).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 403,0518$; trouvé 403,0521 (0,3 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 425,0338$; trouvé 425,0359 (4,9 ppm).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²³³

4-[6-amino-8-méthoxy-2-(2-méthoxyéthoxy) purine-9-ylméthyl] benzonitrile 3.6

Une première solution contenant du sodium (3 éq, 5,37 mmol, 124 mg) additionné à du MeOH anhydre (110 mL), est placée sous argon à température ambiante. Une seconde solution contenant l'hétérocycle aromatique bromé **3.5** (1 éq, 1,79 mmol, 722 mg) dissout dans du DME (55 mL) est également mise sous argon et à température ambiante. Le contenu de la première solution est ajouté à la deuxième. L'ensemble est chauffé au reflux (température atteinte égale à 100°C) pendant 18h. Après addition de NH₄Cl (2 éq, 3,58 mmol, 192 mg) le milieu est concentré et le résidu orangé brut obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (dépôt solide, éluant: DCM/MeOH 95:5). Le composé désiré **3.6** est obtenu sous forme d'un solide blanc (1,78 mmol, 577 mg) avec un rendement de 99%.

CCM: R_f = 0,37 (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3476 (ν N-H) ; 3105, 3094 (ν C_{sp2}-H) ; 2226 (ν C≡N) ; 1646 ; 1608 ; 1565 ; 1494 (ν C=C et C=N) ; 1419 ; 1400 ; 1389 (δ C-H alkyles) ; 1336 ; 1254 ; 1127 ; 1022 (ν C-N et C-O) ; 998 ; 828 ; 786 (δ C-H aromatiques).

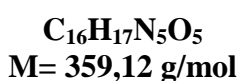
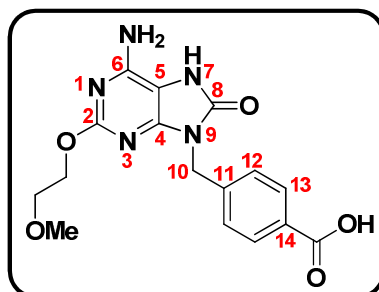
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,27 (3H, s, CH₃O-CH₂) ; 3,57 (2H, t, J= 4,7 Hz, CH₂-O) ; 4,05 (3H, s, CH₃O-C₈) ; 4,27 (2H, t, J= 4,7 Hz, CH₂-O) ; 5,13 (2H, s, 2H₁₀) ; 6,93 (2H, s, NH₂) ; 7,39 (2H, d, J(ortho)_{H12-H13} = 8,4 Hz, 2H₁₂) ; 7,80 (2H, d, J(ortho)_{H13-H12} = 8,4 Hz, 2H₁₃).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 42,4 (C₁₀) ; 55,9 (CH₃O-C₈) ; 57,0 (CH₃O-CH₂) ; 64,2 (CH₂-O) ; 69,3 (CH₂-O) ; 109,1 ; 109,4 (C₅, C₁₄) ; 117,6 (C≡N) ; 127,0 (2C₁₂) ; 131,6 (2C₁₃) ; 141,2 (C₁₁) ; 149,9 ; 152,3 ; 153,5 ; 159,0 (C₂, C₄, C₆, C₈).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+H]⁺ = 355,1519 ; trouvé 355,1505 (3,8 ppm) ; m/z calculé pour [M+Na]⁺ = 377,1338 ; trouvé 377,1357 (5,04 ppm).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²³³

Acide 4-[[6-amino-2-(2-méthoxyéthoxy)-8-oxo-7H-purine-9(8H)-yl]méthyl]benzonitrile 3.7



Une solution contenant l'hétérocycle aromatique **3.6** (1 éq, 1,22 mmol, 433 mg) dissout dans un mélange EtOH/NaOH 10 M (1:1, 87 mL), est chauffée à reflux pendant 15h. Le milieu biphasique est acidifié avec du HCl concentré jusqu'à pH= 1. De l'eau distillée (33 mL) est ajoutée afin de dissoudre le solide blanc obtenu. La phase aqueuse est extraite avec du DCM (3×90 mL) et les phases organiques sont réunies. Après séchage sur MgSO_4 , filtration puis concentration, le résidu blanc obtenu est dilué dans du CH_3CN anhydre (108 mL) puis du NaI (3,4 éq, 4,16 mmol, 623 mg) et du TMS-Cl (3,4 éq, 4,16 mmol, 0,53 mL) sont introduits dans le milieu réactionnel. Ce dernier est chauffé à 40°C pendant 4h sous argon. Ensuite, la solution est refroidie dans un bain de glace pendant 1h puis filtrée sur verre fritté. Après lavage avec de l'eau (5,00 mL) et avec du diéthyléther (2×7,00 mL), le composé **3.7** est obtenu sous forme d'un solide beige (1 mmol, 355 mg) avec un rendement de 82%.

CCM: $R_f = 0,46$ (DCM/MeOH 85:15).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3328 (ν N-H et O-H) ; 3095 ; 3061 (ν $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$) ; 1740 (ν C=O acide carboxylique) ; 1705 (ν C=O urée cyclique) ; 1677 ; 1613 ; 1604 ; 1581 (ν C=N et C=C) ; 1475 ; 1435 ; 1425 (δ C-H alkyles) ; 1357 ; 1311 ; 1297 ; 1126 ; 1018 (ν C-N et C-O) ; 975 ; 862 (δ C-H aromatiques).

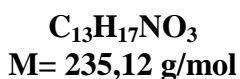
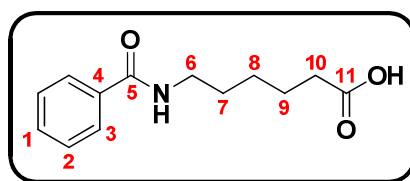
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,24 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-O}$) ; 3,57 (2H, t, $J = 4,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 4,30 (2H, t, $J = 4,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 4,93 (2H, s, 2H_{10}) ; 7,10 (2H, s, NH_2) ; 7,38 (2H, d, $J(\text{ortho})_{\text{H}12\text{-H}13} = 8,2$ Hz, 2H_{12}) ; 7,88 (2H, d, $J(\text{ortho})_{\text{H}13\text{-H}12} = 8,2$ Hz, 2H_{13}) ; 10,75 (1H, s, COOH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 46,1 (C_{10}) ; 58,0 ($\text{CH}_3\text{-O}$) ; 66,3 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 69,4 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 95,6 (C_5) ; 126,7 (2C_{12}) ; 126,9 (2C_{13}) ; 130,0 (C_{14}) ; 140,1 (C_{11}) ; 145,8 (C_4) ; 151,0 ; 153,2 ; 155,0 ($\text{C}_2, \text{C}_6, \text{C}_8$) ; 170,2 (C=O acide carboxylique).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 360,1308$; trouvé 360,1304 (1,1 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 382,1127$; trouvé 382,1114 (3,4 ppm).

Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.²³⁴

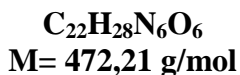
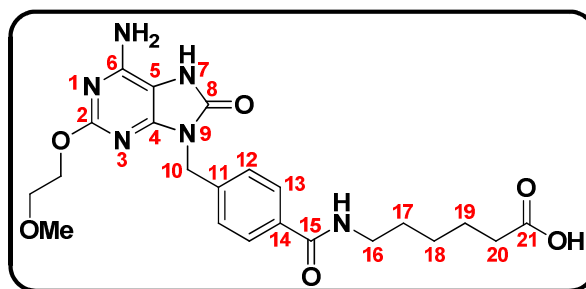
Acide 6-benzamidohexanoïque **3.10**



Une première solution contenant l'acide aminocaproïque (2 éq, 1,52 mmol, 200 mg) dissout dans 15 mL d'un mélange DMF/ H_2O (1:1), est tout d'abord préparée sous argon à 0°C. Une seconde solution contenant l'acide benzoïque (1 éq, 0,76 mmol, 93 mg) dilué dans 15 mL de DMF, est par la suite préparée sous argon à température ambiante, dans laquelle est ajoutée la $\text{N}(\text{Bu})_3$ (1,2 éq, 0,91 mmol, 0,22 mL). Après agitation pendant 10 min, le chloroformiate d'isobutyle (1,2 éq, 0,91 mmol, 0,12 mL) est introduit dans ce milieu. Après de nouveau 10 min d'agitation, la seconde solution est mélangée avec la première à l'aide d'une canule. Le milieu réactionnel est placé sous argon pendant 2h30 à 0°C puis concentré. Après dilution du résidu obtenu dans 3,00 mL d'eau ultrapure, le mélange est acidifié jusqu'à pH= 2 en utilisant du HCl 1N. Enfin 30 mL d' H_2O sont introduits et la phase aqueuse est lavée avec 2×30 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont réunies, concentrées et purifiées par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 95:5) pour donner le composé **3.10** (0,57 mmol, 134 mg) sous forme de solide blanc avec un rendement de 75%.

CCM: $R_f = 0,20$ (DCM/MeOH 95:5).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,40-1,50 (2H, m, 2H_8) ; 1,62-1,70 (4H, m, $2\text{H}_7, 2\text{H}_9$) ; 2,37 (2H, t, $J_{\text{H}_{10}\text{-H}_9} = 7,4$ Hz, 2H_{10}) ; 3,46 (2H, m, 2H_6) ; 6,29 (1H, se, NH) ; 7,42 (2H, m, 2H_2) ; 7,48 (1H, m, H_1) ; 7,75 (2H, m, 2H_3).



Une première solution contenant l'acide aminocaproïque (5 éq, 0,975 mmol, 128 mg) dissout dans un mélange DMF/H₂O (1:1, 4,00 mL en tout), est mise sous argon à 0°C. Dans une seconde solution contenant l'hétérocycle **3.7** (1 éq, 0,19 mmol, 70 mg) dilué dans du DMF (4 mL), également placée sous argon à température ambiante, est ajouté la N(Bu)₃ (1,5 éq, 0,292 mmol, 70 µL). Après agitation pendant 10 min, le chloroformiate d'isobutyle (1,5 éq, 0,292 mmol, 38 µL) est introduit. Après de nouveau 10 min d'agitation, le contenu du deuxième ballon est versé dans le premier à l'aide d'une canule. Le milieu réactionnel est placé sous argon pendant 28h à 0°C. La solution est, ensuite, concentrée. Après dilution du résidu obtenu dans de l'eau ultrapure (7,00 mL), le mélange est acidifié jusqu'à pH= 1 en utilisant du HCl 1N. L'ensemble est refroidi à 0°C pendant quelques heures puis filtré et rincé avec un minimum d'eau. Le composé **3.11** (1,08 mmol, 51 mg) est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 55%.

CCM: $R_f = 0,46$ (DCM/MeOH 85:15).

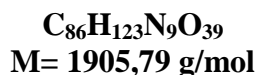
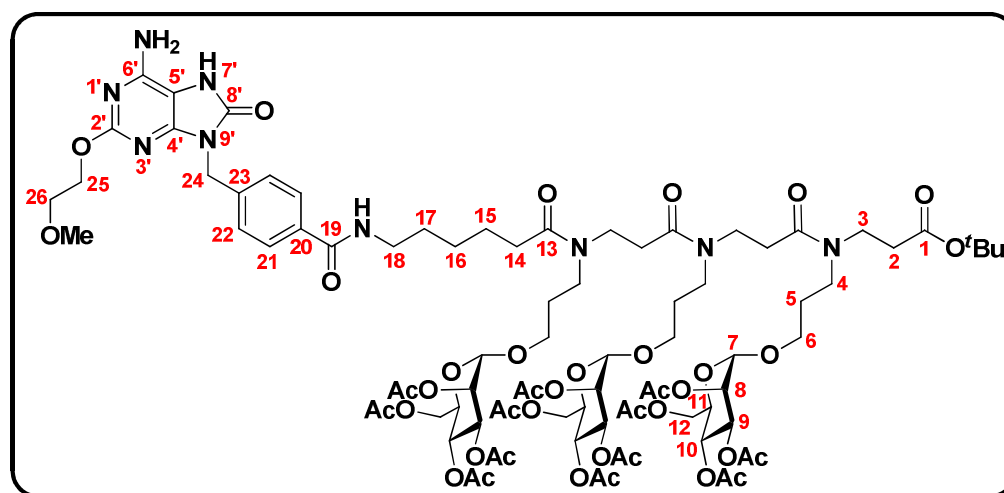
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3419 (ν N-H, O-H) ; 3103 ; 3039 (ν C_{sp2}-H) ; 2935 ; 2858 (ν C_{sp3}-H) ; 1705 ; 1636 ; 1616 (ν C=O urée cyclique, amide, acide carboxylique) ; 1553 ; 1506 ; 1452 (ν C=N, C=C) ; 1419 ; 1375 (δ C-H alkyles) ; 1348 ; 1327 ; 1125 ; 1092 (ν C-N, C-O) ; 949 ; 779 ; 717 (δ C-H aromatiques).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,26 (2H, m, 2H₁₈) ; 1,50 (4H, m, 2H₁₇ et 2H₁₉) ; 2,19 (2H, t, *J*_{H20-H19} = 7,2 Hz, 2H₂₀) ; 3,21 (2H, m, 2H₁₆) ; 3,26 (3H, s, CH₃-O) ; 3,56 (2H, t, *J* = 4,5 Hz, CH₂-O) ; 4,24 (2H, t, *J* = 4,5 Hz, CH₂-O) ; 4,89 (2H, s, 2H₁₀) ; 6,53 (2H, s, NH₂) ; 7,34 (2H, d, *J*(*ortho*)_{H12-H13} = 8,0 Hz, 2H₁₂) ; 7,76 (2H, d, *J*(*ortho*)_{H13-H12} = 8,0 Hz, 2H₁₃) ; 8,39 (1H, t, *J*_{NH-H16} = 5,0 Hz, NH amide) ; 10,00 (1H, s, NH urée cyclique) ; 12,00 (1H, s, COOH).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 23,2 (C_{19}) ; 24,9 (C_{18}) ; 27,8 (C_{17}) ; 32,6 (C_{20}) ; 38,0 (C_{16}) ; 41,1 (C_{10}) ; 57,0 ($\text{CH}_3\text{-O}$) ; 64,3 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 69,2 ($\text{CH}_2\text{-O}$) ; 97,3 (C_5) ; 126,2 (2C_{12}) ; 126,3 (2C_{13}) ; 133,0 (C_{14}) ; 139,0 (C_{11}) ; 146,7 (C_4) ; 150,0 ; 151,2 ; 153,0 ($\text{C}_2, \text{C}_6, \text{C}_8$) ; 167,0 (C_{15}) ; 173,4 (C_{21}).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 473,2149$; trouvé 473,2146 (0,5 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 495,1968$; trouvé 495,1957 (2,2 ppm).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptotide *O*-Man 3.12



La synthèse de l'édifice *O*-mannosylé **3.12** consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique, en utilisant:

- L'hétérocycle aromatique **3.11** (1 éq, 0,024 mmol, 11,5 mg)
- La plateforme β -tripeptotide *O*-mannose **2.27** (1 éq, 0,024 mmol, 35,5 mg)
- HATU (2 éq, 0,05 mmol, 18,6 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,06 mmol, 10 μL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 1,05 mL et 0,45 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 40h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: AcOEt/MeOH 95:5 puis 90:10), l'édifice

glycosylé **3.12** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,012 mmol, 23 mg) avec un rendement de 53%.

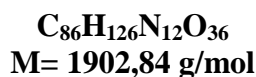
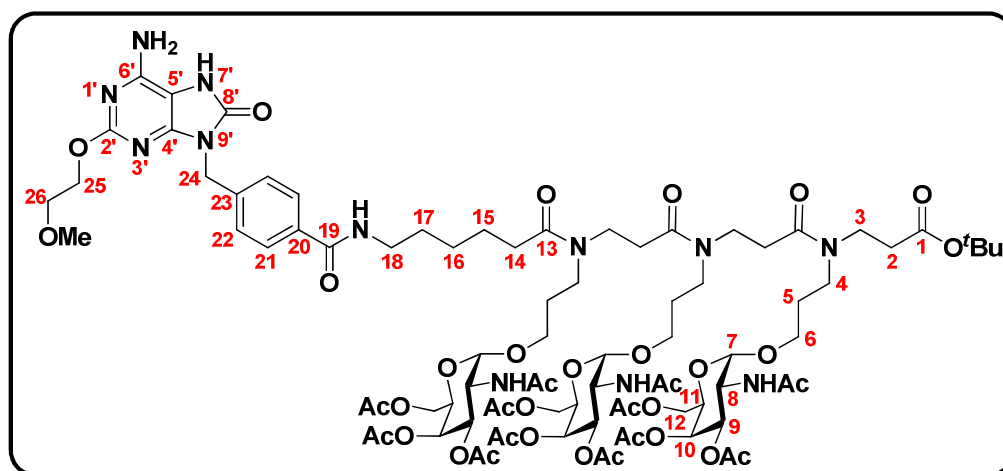
CCM: $R_f = 0,60$ (AcOEt/MeOH 90:10).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3352 ; 3329 (ν N-H) ; 2962 ; 2925 ; 2858 (ν C_{sp^3} -H) ; 1745 ; 1733 ; 1657 ; 1645 ; 1640 ; 1633 ; 1628 ; 1617 (ν C=O urée cyclique, esters, amides) ; 1571 ; 1541 ; 1460 (ν C=C, C=N, δ N-H) ; 1438 ; 1428 ; 1378 (δ C-H alkyles) ; 1260 ; 1233 ; 1222 ; 1159 ; 1153 ; 1130 ; 1081 ; 1076 ; 1034 (ν C-O, ν C-N) ; 800 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (1H, s, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,58-1,90 (12H, m, 6H_5 , 2H_{15} , 2H_{16} , 2H_{17}) ; 1,93-2,15 (36H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,25-2,72 (8H, m, 6H_2 , 2H_{14}) ; 3,34-3,76 (25H, m, 6H_3 , 6H_4 , 6H_6 , 2H_{18} , 2H_{25} ou 2H_{26} , O- CH_3) ; 3,97 (3H, m, 3H_{11}) ; 4,09 (3H, m, 3H_{12} ou $3\text{H}_{12'}$) ; 4,28 (3H, dd, $J_{\text{H}12 \text{ ou } \text{H}12'-\text{H}11} = 4,7$ Hz et $J_{\text{H}12-\text{H}12'} = 12,1$ Hz, 3H_{12} ou $3\text{H}_{12'}$) ; 4,41 (2H, m, 2H_{25} ou 2H_{26}) ; 4,81 (3H, m, 3H_7) ; 5,00 (2H, m, 2H_{24}) ; 5,16-5,31 (9H, m, 3H_8 , 3H_9 , 3H_{10}) ; 5,73 (2H, m, NH_2) ; 7,36-7,44 (3H, m, 2H_{22} , NH espaceur) ; 7,80 (2H, d, $J_{\text{H}21-\text{H}22} = 7,9$ Hz, 2H_{21}) ; 10,07 (1H, m, NH cyclique).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,9 ; 21,0 ; 21,1 ; 21,2 ($12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,7 ; 27,8 ; 27,9 ; 28,0 ; 28,3 ; 29,0 ; 29,1 ; 29,9 ; 30,7 (3C_5 , C_{15} , C_{16} , C_{17} , $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 31,7 ; 32,3 ; 32,9 ; 33,1 ; 34,1 ; 34,8 ; 35,7 (3C_2 , C_{14}) ; 43,1 ; 43,2 ; 43,3 ; 43,4 ; 43,5 ; 45,6 ; 45,7 ; 45,8 ; 46,0 (3C_3 , 3C_4 , C_{18} , C_{24}) ; 59,2 (O- CH_3) ; 62,7 (3C_{12}) ; 65,2 ; 65,3 ; 65,4 ; 65,5 ; 66,1 ; 66,2 ; 66,3 ; 66,4 ; 66,5 ; 66,6 ; 66,7 ; 68,7 ; 68,8 ; 68,9 ; 69,3 ; 69,4 ; 69,5 ; 69,6 ; 69,7 ; 69,8 (3C_6 , 3C_8 , 3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11} , C_{25} ou C_{26}) ; 71,0 (C_{25} ou C_{26}) ; 81,9 ; 82,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 97,7 ; 97,8 ; 97,9 (3C_7) ; 99,5 (C_5') ; 127,7 ; 127,8 ; 128,5 ; 128,6 (2C_{21} , 2C_{22}) ; 134,4 ; 134,5 ; 139,9 ; 140,1 (C_{20} , C_{23}) ; 144,6 ; 148,1 ; 153,2 ; 160,7 (C_2 , C_4 , C_6 , C_8) ; 169,8 ; 169,9 ; 170,1 ; 170,2 ; 170,3 ; 170,7 ; 170,9 ; 171,0 ; 171,4 ($12\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptoïde, C_1 , C_{13} , C_{19}).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 953,9037$; trouvé 953,9047 (1 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}/2 = 964,8947$; trouvé 964,9034 (9 ppm).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptoïde *O*-GalNAc **3.13**

La synthèse de l'édifice *O*-GalNAc **3.13** consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique, en utilisant:

- L'hétérocycle aromatique **3.11** (1 éq, 0,022 mmol, 10,4 mg)
- La plateforme β -tripeptoïde *O*-GalNAc **2.38** (1 éq, 0,022 mmol, 31,9 mg)
- HATU (2 éq, 0,044 mmol, 16,7 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,051 mmol, 10 μ L)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 1,05 mL et 0,45 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 48h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: AcOEt/MeOH 90:10, 85:15 puis 80:20), l'édifice glycosylé **3.13** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,012 mmol, 22 mg) avec un rendement de 53%.

CCM: $R_f = 0,64$ (AcOEt/MeOH 85:15).

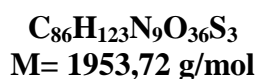
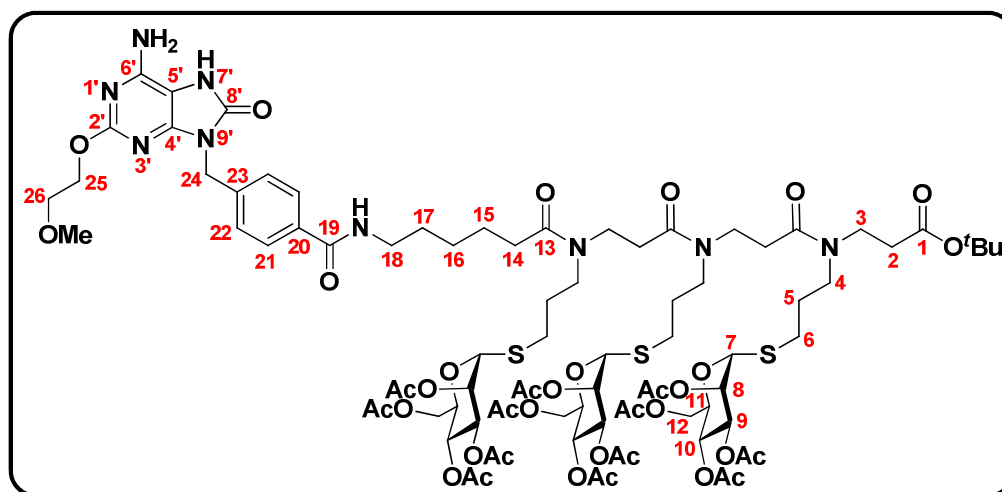
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3354 ; 3330 (ν N-H) ; 2960, 2923, 2853 (ν C_{sp^3} -H) ; 1746 ; 1733 ; 1656 ; 1649 ; 1640 ; 1633 ; 1622 ; 1615 (ν C=O urée cyclique, esters, amides) ; 1570 ; 1541 ; 1460 (ν C=C et C=N, δ N-H) ; 1436 ; 1428 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1259 ; 1233 ; 1227 ; 1158 ; 1153 ; 1129 ; 1081 ; 1075 ; 1035 (ν C-O, ν C-N) ; 800 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,54-1,85 (12H, m, 6H_5 , 2H_{15} , 2H_{16} , 2H_{17}) ; 1,90-2,16 (36H, m, $9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 2,20-2,70 (8H, m, 6H_2 , 2H_{14}) ; 3,30-3,74 (25H, m, 6H_3 , 6H_4 , 6H_6 , 2H_{18} , 2H_{25} ou 2H_{26} , O- CH_3) ; 4,05-4,27 (9H, m, 3H_{11} , 6H_{12}) ; 4,43 (2H, m, 2H_{25} ou 2H_{26}) ; 4,53-4,64 (3H, m, 3H_8) ; 4,85-5,08 (5H, m, 3H_7 , 2H_{24}) ; 5,15 (3H, m, 3H_9) ; 5,37 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,77 (2H, m, NH_2) ; 6,76-7,73 (8H, m, 2H_{21} , 2H_{22} , NH espaceur, $3\times\text{NH}$ acétamides) ; 10,16 (1H, m, NH cyclique).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,9 ; 21,0 ; 23,2 ($9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 28,2 ; 28,3 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 29,3 ; 29,4 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 29,9 ; 30,0 ; 30,1 (3C_5 , C_{15} , C_{16} , C_{17}) ; 32,1 ; 33,5 ; 34,3 ; 35,2 ; 36,1 (3C_2 , C_{14}) ; 43,2 ; 43,3 ; 43,4 ; 44,2 ; 44,7 ; 45,8 ; 46,6 ; 46,7 (3C_3 , 3C_4 , C_{18} , C_{24}) ; 47,7 ; 47,8 ; 47,9 ; 48,0 ; 48,1 ; 48,2 (3C_8) ; 59,2 (O- CH_3) ; 62,1 ; 62,2 ; 62,3 ; 62,4 ; 62,5 (3C_{12}) ; 66,5 ; 66,6 ; 66,7 (3C_6 , C_{25} ou C_{26}) ; 66,8 ; 66,9 ; 67,0 ; 67,2 ; 67,3 ; 67,4 ; 67,5 ; 67,6 ; 68,3 (3C_9 , 3C_{10} , 3C_{11}) ; 70,9 (C_{25} ou C_{26}) ; 81,9 ; 82,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 97,0 ($\text{C}_{5'}$) ; 97,9 ; 98 ; 98,1 (3C_7) ; 127,5 ; 128,6 (2C_{21} , 2C_{22}) ; 134,2 ; 139,8 (C_{20} , C_{23}) ; 144,1 ; 149,9 ; 153,6 ; 160,7 (C_2 , C_4 , C_6 , C_8) ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,0 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,3 ; 171,4 ; 171,5 ; 171,6 ; 171,7 ; 171,8 ; 171,9 ($9\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $3\times\text{C}=\text{O}$ acétamides, $2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptoïde, C_1 , C_{13} , C_{19}).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 952,4277$; trouvé 952,4245 (3,4 ppm).

$[\alpha]$ = +286 (T = 25°C ; c = 0,052 ; CHCl_3).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptotide S-Man 3.14

La synthèse de l'édifice S-mannosylé **3.14** consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique, en utilisant:

- L'hétérocycle aromatique **3.11** (1 éq, 0,02 mmol, 9,6 mg)
- La plateforme β -tripeptotide S-mannose **2.51** (1 éq, 0,02 mmol, 30,5 mg)
- HATU (2 éq, 0,04 mmol, 15,4 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,05 mmol, 9 μL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 0,90 mL et 0,40 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 42h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: AcOEt/MeOH 95:5 puis 90:10), l'édifice glycosylé **3.14** est obtenu sous forme d'une mousse jaune clair (0,011 mmol, 21,4 mg) avec un rendement de 55%.

CCM: $R_f = 0,46$ (AcOEt/MeOH 90:10).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3355 (ν N-H) ; 2952 ; 2923 (ν C_{sp^3} -H) ; 1748 ; 1743 ; 1653 ; 1623 (ν C=O urée cyclique, esters, amides) ; 1541 ; 1472 (ν C=C, C=N, δ N-H) ; 1424 ; 1372 (δ C-H alkyles) ; 1235 ; 1222 ; 1106 ; 1082 ; 1049 ; 10345 (ν C-O, ν C-N).

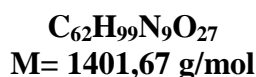
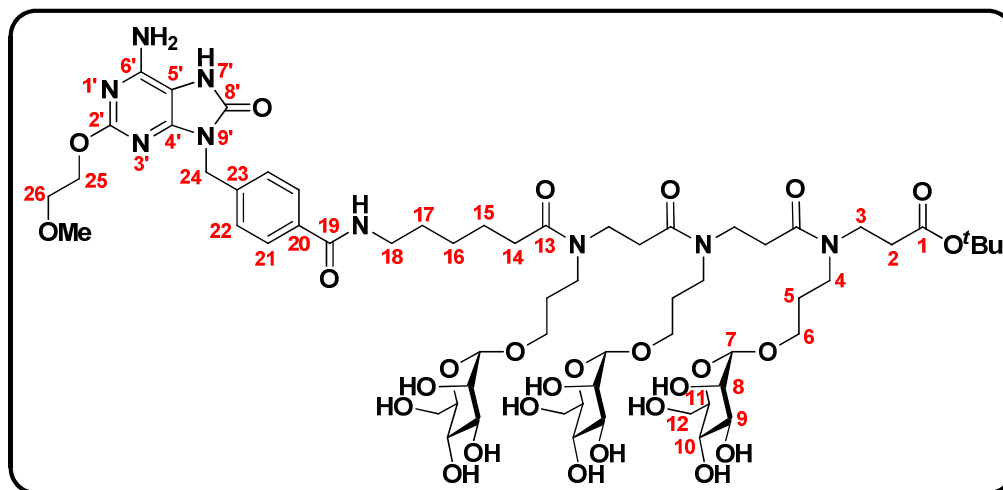
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (1H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,57-1,93 (12H, m, 6H_5 , 2H_{15} , 2H_{16} , 2H_{17}) ; 1,95-2,17 (36H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,29-2,72 (14H, m, 6H_2 ,

$6\text{H}_6, 2\text{H}_{14}$) ; 3,23-3,65 (17H , m, $6\text{H}_3, 6\text{H}_4, 2\text{H}_{18}, \text{O}-\text{CH}_3$) ; 3,71 (2H , m, 2H_{25} ou 2H_{26}) ; 4,09 (3H , m, 3H_{12} ou $3\text{H}_{12}'$) ; 4,27-4,37 (6H , m, $3\text{H}_{11}, 3\text{H}_{12}$ ou $3\text{H}_{12}'$) ; 4,42 (2H , m, 2H_{25} ou 2H_{26}) ; 5,00 (2H , s, 2H_{24}) ; 5,17-5,37 (12H , m, $3\text{H}_7, 3\text{H}_8, 3\text{H}_9, 3\text{H}_{10}$) ; 5,65 (2H , m, NH_2) ; 7,36-7,42 (3H , m, $2\text{H}_{22}, \text{NH}$ espaceur) ; 7,80 (2H , m, 2H_{21}) ; 9,93 (1H , m, NH cyclique).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,8 ; 20,9 ; 21,0 ; 21,1 ($12 \times \text{CH}_3$ acétates) ; 27,5 ; 28,3 ; 28,6 ; 28,7 ; 28,9 ; 29,8 ; 29,9 ; 32,9 ; 33,5 ; 34,1 ($3\text{C}_2, 3\text{C}_5, 3\text{C}_6, \text{C}_{14}, \text{C}_{15}, \text{C}_{16}, \text{C}_{17}, 3 \times \text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 43,2 ; 43,3 ; 44,9 ; 47,6 ; 51,2 ; 51,3 ; 51,5 ; 52,5 ($3\text{C}_3, 3\text{C}_4, \text{C}_{18}, \text{C}_{24}$) ; 59,2 ($\text{O}-\text{CH}_3$) ; 62,5 (3C_{12}) ; 66,3 ; 66,4 ; 69,2 ; 69,3 ; 69,4 ; 69,6 ; 69,5 ; 69,7 ; 70,9 ; 71,1 ; 71,2 ($3\text{C}_8, 3\text{C}_9, 3\text{C}_{10}, 3\text{C}_{11}, \text{C}_{25}, \text{C}_{26}$) ; 82,4 ; 82,5 ; 82,6 (3C_7) ; 84,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 99,5 (C_5') ; 127,7 ; 128,4 ($2\text{C}_{21}, 2\text{C}_{22}$) ; 134,4 ; 139,9 ($\text{C}_{20}, \text{C}_{23}$) ; 147,9 ; 149,9 ; 150,0 ; 160,7 ($\text{C}_2', \text{C}_4', \text{C}_6', \text{C}_8'$) ; 169,9 ; 170,0 ; 170,1 ; 170,2 ; 170,3 ; 170,4 ; 170,8 ; 170,9 ($12 \times \text{C}=\text{O}$ acétates, $2 \times \text{C}=\text{O}$ plateforme peptidique, $\text{C}_1, \text{C}_{13}, \text{C}_{19}$).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 977,8689$; trouvé 977,8150 ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}/2 = 996,8468$; trouvé 996,8468 (5,7 ppm).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptidique *O*-Man(OH) 3.15



Une solution contenant l'édifice *O*-mannosylé **3.12** (0,0028 mmol, 5,3 mg) dilué dans 0,80 mL de MeOH anhydre, est traitée par 74 μL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH=8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+).

La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **3.15** sous forme de solide blanc (0,0028 mmol, 3,9 mg) de manière quantitative.

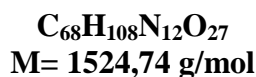
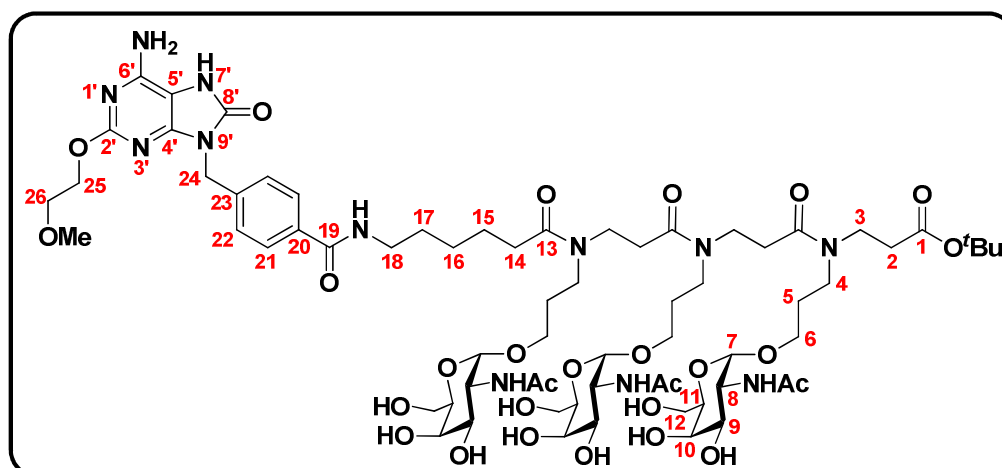
CCM: $R_f = 0,60$ (Propanol/H₂O 70:30).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3508-3175 (ν N-H, O-H) ; 2928 ; 2859 (ν C_{sp3}-H) ; 1710 ; 1645 ; 1630 ; 1620 (ν C=O urée cyclique, amides) ; 1560 ; 1465 (ν C=C, C=N, δ N-H) ; 1373 ; 1345 (δ C-H alkyles) ; 1155 ; 1120 ; 1061 ; 1040 (ν C-O, ν C-N) ; 971 (δ C-H aromatiques).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1,57-1,71 (6H, m, 2H₁₅, 2H₁₆, 2H₁₇) ; 1,78-1,95 (6H, m, 6H₅) ; 2,32-2,84 (8H, m, 6H₂, 2H₁₄) ; 3,39-3,98 (43H, 6H₃, 6H₄, 6H₆, 3H₈, 3H₉, 3H₁₀, 3H₁₁, 6H₁₂, 2H₁₈, 2H₂₅ ou 2H₂₆, O-CH₃) ; 4,45 (2H, m, 2H₂₅ ou 2H₂₆) ; 4,72 (3H, m, 3H₇) ; 5,07 (2H, s, 2H₂₄) ; 7,50 (2H, d, $J_{H25-H24} = 8,1$ Hz, 2H₂₂) ; 7,80 (2H, d, $J_{H24-H25} = 7,7$ Hz, 2H₂₁).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 26,3 ; 27,8 ; 28,5 ; 28,6 ; 29,5 ; 29,4 ; 30,0 30,1 ; 30,2 ; 30,3 ; 30,5 ; 30,7 (3C₅, C₁₅, C₁₆, C₁₇) ; 32,1 ; 33,4 ; 33,9 ; 34,0 ; 35,1 ; 35,5 (3C₂, C₁₄) ; 40,7 ; 40,9 ; 42,9 ; 44,0 ; 44,2 ; 44,8 ; 46,6 ; 47,2 ; 47,4 ; 59,2 ; 63,0 ; 65,1 ; 65,4 ; 65,5 ; 66,1 ; 66,3 ; 67,8 ; 68,7 ; 68,8 ; 71,9 ; 72,2 ; 72,4 ; 72,5 ; 74,8 ; 74,9 (3C₃, 3C₄, 3C₆, 3C₈, 3C₉, 3C₁₀, 3C₁₁, 3C₁₂, C₁₈, C₂₄, C₂₅, C₂₆, O-CH₃) ; 80,2 (C(CH₃)₃) ; 94,9 (C_{5'}) ; 128,2 ; 129,1 (2C₂₁, 2C₂₂) ; 134,4 ; 139,8 (C₂₀, C₂₃) ; 141,5 ; 149,7 ; 150,7 ; 154,9 ; 161,7 (C_{2'}, C_{4'}, C_{6'}, C_{8'}) ; 169,8 ; 172,7 ; 173,3 ; 173,5 ; 174,4 (2×C=O plateforme peptoïde, C₁, C₁₃, C₁₉).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour [M+2H]²⁺/2 = 701,8403 ; trouvé 701,8415 (1,6 ppm) ; m/z calculé pour [M+H+Na]²⁺/2 = 712,8313 ; trouvé 712,8329 (2,4 ppm).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptoïde *O*-GalNAc(OH) **3.16**

Une solution contenant l'édifice *O*-GalNAc **3.13** (0,0083 mmol, 15,7 mg) dilué dans 2,40 mL de MeOH anhydre, est traitée par 0,23 mL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH= 8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+). La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **3.16** sous forme de solide blanc (0,0083 mmol, 12,6 mg) de manière quantitative.

CCM: $R_f = 0,23$ (Propanol/ H_2O 70:30).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3501-3181 (ν N-H, O-H) ; 2928 ; 2853 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1720 ; 1642 ; 1625 ; 1615 (ν C=O urée cyclique et amides) ; 1555 ; 1465 (ν C=C et C=N, δ N-H) ; 1374 ; 1340 (δ C-H alkyles) ; 1153 ; 1123 ; 1060 ; 1039 (ν C-O, ν C-N) ; 971 (δ C-H aromatiques).

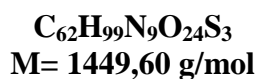
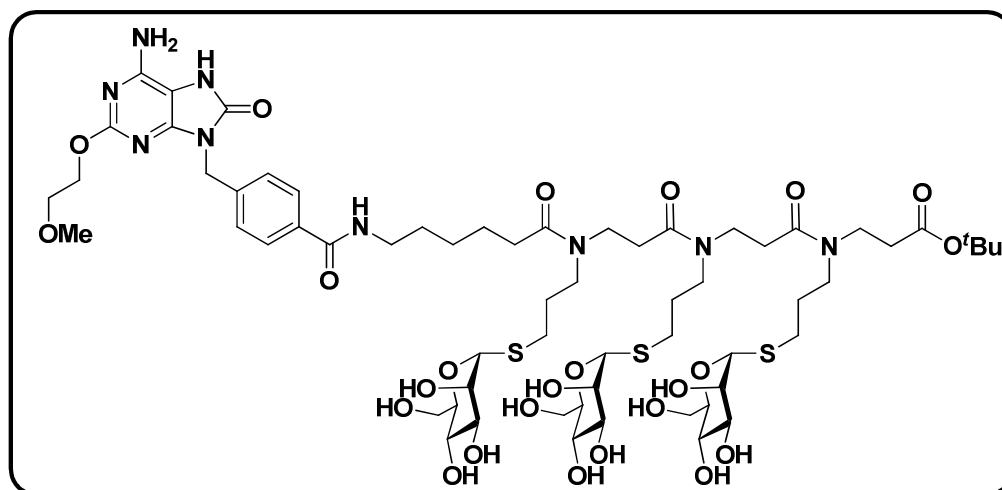
RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1,42-1,45 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,55-1,71 (6H, m, 2H_{15} , 2H_{16} , 2H_{17}) ; 1,75-1,93 (6H, m, 6H_5) ; 1,99-2,03 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 2,38-2,88 (8H, m, 6H_2 , 2H_{14}) ; 3,33-3,90 (40H, 6H_3 , 6H_4 , 6H_6 , 3H_9 , 3H_{10} , 3H_{11} , 6H_{12} , 2H_{18} , 2H_{25} ou 2H_{26} , O- CH_3) ; 4,28 (3H, m, 3H_8) ; 4,45 (2H, m, 2H_{25} ou 2H_{26}) ; 4,75-4,83 (3H, m, 3H_7) ; 5,01 (2H, s, 2H_{24}) ; 7,47 (2H, d, $J_{\text{H}22-\text{H}21} = 8,2 \text{ Hz}$, 2H_{22}) ; 7,78 (2H, d, $J_{\text{H}21-\text{H}22} = 8,2 \text{ Hz}$, 2H_{21}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 22,8 ($3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 23,7 ; 26,3 ; 27,7 ; 27,8 ; 28,4 ; 28,6 ; 28,7 ; 30,1 ; 30,2 ; 30,3 ; 30,4 ; 30,5 ; 30,6 ; 30,8 (3C_5 , C_{15} , C_{16} , C_{17} , $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 32,0 ; 32,5 ; 33,1 ; 33,9 ; 34,7 ; 34,8 ; 34,9 ; 35,4 ; 35,6 ; 38,1 ; 38,2 (3C_2 , C_{14}) ; 40,1 ; 44,0 ; 44,3 ; 47,3 ; 47,4 ; 51,6 ; 51,7 ; 59,2 ; 62,9 ; 65,9 ; 66,0 ; 66,2 ; 66,3 ; 66,4 ; 66,5 ; 66,6 ; 66,7 ; 67,9 ; 69,6 ; 69,7 ; 69,8 ; 69,9 ; 70,0 ; 71,7 ; 72,6 ; 72,8 ; 72,9 ; 73,0 (3C_3 , 3C_4 , 3C_6 ,

$3C_8, 3C_9, 3C_{10}, 3C_{11}, 3C_{12}, C_{18}, C_{24}, C_{25}, C_{26}, O-CH_3$; 84,0 ($C(CH_3)_3$) ; 93,0 (C_5') ; 128,7 ; 129,1 ($2C_{21}, 2C_{22}$) ; 135,0 ; 139,2 (C_{20}, C_{23}) ; 141,4 ; 148,7 ; 150,8 ; 160,8 (C_2, C_4', C_6', C_8') ; 169,7 ; 171,2 ; 172,3 ; 173,9 ; 174,0 ($2 \times C=O$ plateforme peptidique, $3 \times C=O$ acétamides, C_1, C_{13}, C_{19}).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[M+2H]^{2+}/2 = 763,3802$; trouvé 763,3774 (3,7 ppm).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptide *O*-Man(OH) **3.17**



Une solution contenant l'édifice *O*-mannosylé **3.14** (0,0053 mmol, 10,3 mg) dilué dans 1,40 mL de MeOH anhydre, est traitée par 0,27 mL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH= 8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **3.17** sous forme de solide blanc (0,0053 mmol, 7,6 mg) de manière quantitative.

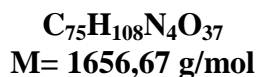
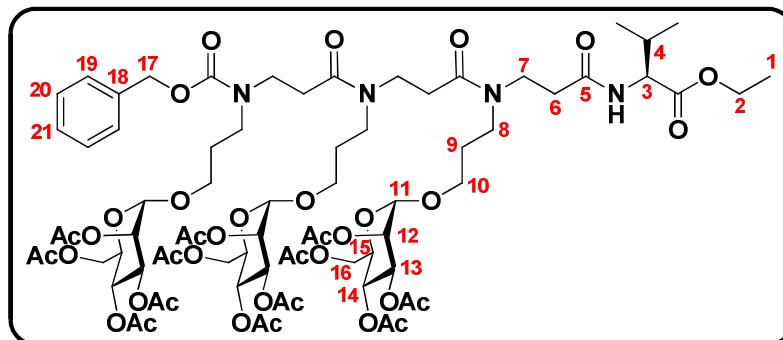
CCM: $R_f = 0,55$ (Propanol/H₂O 70:30).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3510-3176 (ν N-H, O-H) ; 2930 ; 2859 (ν C_{sp3}-H) ; 1710 ; 1645 ; 1639 ; 1615 (ν C=O urée cyclique et amides) ; 1566 ; 1465 (ν C=C et C=N, δ N-H) ; 1374 ; 1348 (δ C-H alkyles) ; 1155 ; 1128 ; 1061 ; 1040 (ν C-O, ν C-N) ; 972 (δ C-H aromatiques).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[M+2H]^{2+}/2 = 725,8056$; trouvé 725,8070 (1,9 ppm).

E. Procédures expérimentales du chapitre IV

Plateforme β -tripeptide *O*-Man 4.2



La synthèse de la plateforme β -tripeptide *O*-mannosylée **4.2** se déroule en trois étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale d'hydrolyse de l'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **2.32** (1 éq, 0,015 mmol, 24 mg)
- Du TFA (125 μL)
- Du DCM (125 μL)

L'acide carboxylique est obtenu au bout de 30 min d'agitation, sous forme d'une huile orangée de manière quantitative. Par la suite, celui-ci est directement engagé dans une réaction d'estérification de Steglich (formation de l'ester activé). Cet acide carboxylique (1 éq, 0,015 mmol) est dilué dans 0,50 mL de DCM anhydre, en présence de pentafluorophénol (1,1 éq, 0,017 mmol, 1,8 μL), de DCC (1,87 éq, 0,028 mmol, 6 mg) et de DMAP (0,2 éq, 0,4 mg). Afin d'accélérer l'avancement de la réaction, 1 éq de DCC et de pentafluorophénol ainsi que 0,4 éq de DMAP, sont ajoutés au bout de 21h d'agitation sous argon à température ambiante. Au final, le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 46h. Après filtration et concentration, ce milieu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 98:2) pour donner l'ester de pentafluorophényle **4.1** avec un rendement intermédiaire de 70%. Pour la dernière étape, une solution contenant cet ester (1 éq, 0,007 mmol, 12 mg), le chlorure d'ester éthylique de L-valine (1 éq, 0,007 mmol, 1,3 mg), la triéthylamine (1,5 éq, 0,011 mmol, 1,5 μL) dissouts dans un mélange DMF/DCM (80:20, 0,90 mL), est mise sous agitation sous argon à température

ambiante pendant une nuit. Après concentration du milieu, le milieu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 97:3) pour donner le composé **4.2** attendu avec un rendement de 90%.

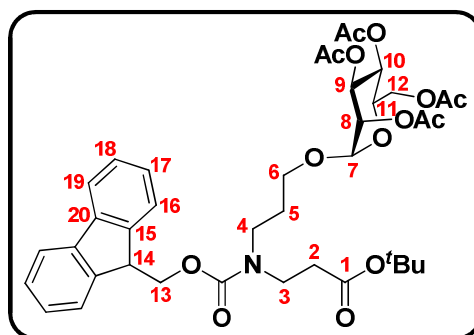
CCM: $R_f = 0,10$ (DCM/MeOH 99:1).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 1747 ; 1735 (ν C=O esters) ; 1705 ; 1648 (ν C=O amides, carbamate) ; 1485 (ν C=C aromatique) ; 1447 ; 1427 ; 1374 (δ C-H alkyles) ; 1220 ; 1138 ; 1086 ; 1039 (ν C-O, ν C-N) ; 980 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0,87-1,00 (6H, m, $2\times\text{CH}_3$) ; 1,24-1,30 (4H, m, 3H_1 , H_4) ; 1,82-1,91 (6H, m, 6H_9) ; 1,96-2,17 (36H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,50-2,73 (6H, m, 6H_6) ; 3,31-3,77 (16H, m, 6H_7 , 6H_8 , 4H_{10}) ; 3,90-4,33 (14H, m, 2H_2 , 2H_{10} , 3H_{15} , 6H_{16} , NH) ; 4,50 (1H, m, H_3) ; 4,79 (3H, m, 3H_{11}) ; 5,13 (2H, m, 2H_{17}) ; 5,19-5,35 (9H, m, 3H_{12} , 3H_{13} , 3H_{14}) ; 7,28-7,36 (5H, m, 2H_{19} , 2H_{20} , H_{21}).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 829,3419$; trouvé 829,3450 (3,7 ppm).

Monomère *O*-Man 4.6



$\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{NO}_{14}$
M= 755,32 g/mol

La synthèse du monomère *O*-mannosylé **4.6** consiste à appliquer la procédure générale de protection d'amine par un Fmoc, en utilisant:

- Le monomère amine mannose **2.12** (1 éq, 0,78 mmol, 416 mg)
- Le Fmoc-Cl (2 éq, 1,60 mmol, 402 mg)
- Une solution de NaHCO_3 saturée (4,30 mL)
- Du 1,4-dioxane (2,80 mL)

Après traitement du milieu (détailé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (Cyclohexane/AcOEt 60:40), le composé **4.6** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (0,71 mmol, 535 mg) avec un rendement de 91%.

CCM: $R_f = 0,40$ (AcOEt/Cyclohexane 40:60).

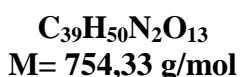
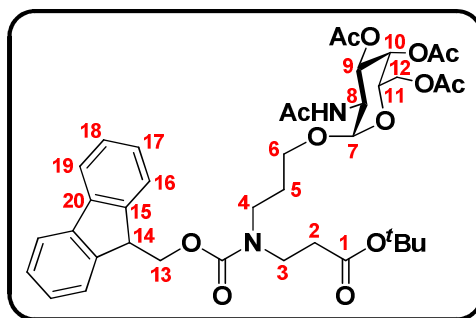
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2964 ; 2939 ; 2920 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1747 (ν C=O esters) ; 1701 (ν C=O carbamate) ; 1479 ; 1450 (ν C=C aromatique) ; 1423 ; 1368 (δ C-H alkyles) ; 1220 ; 1151 ; 1136 ; 1084 ; 1047 (ν C-O , ν C-N carbamate) ; 980 ; 760 ; 742 (δ C-H aromatique).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,50-1,80 (2H, m, 2H_5) ; 1,98 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,01 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,08 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,14 (3H, s, CH_3 acétate) ; 2,23 (1H, t, $J_{\text{H}_2 \text{ ou } \text{H}_2'-\text{H}_3} = 6,4$ Hz, H_2 ou H_2') ; 2,43 (1H, t, $J_{\text{H}_2 \text{ ou } \text{H}_2'-\text{H}_3} = 6,4$ Hz, H_2 ou H_2') ; 3,11-3,69 (6H, m, H_3 , H_4 , H_6) ; 3,95 (1H, m, H_{11}) ; 4,07 (1H, dd, $J_{\text{H}_{12} \text{ ou } \text{H}_{12}'-\text{H}_{11}} = 2,1$ Hz et $J_{\text{H}_{12}-\text{H}_{12}'} = 12,1$ Hz, H_{12} ou H_{12}') ; 4,25 (2H, m, H_{14} et H_{12} ou H_{12}') ; 4,52 (2H, m, 2H_{13}) ; 4,75 (1H, m, H_7) ; 5,25 (3H, m, H_8 , H_9 , H_{10}) ; 7,30 (2H, t, $J_{\text{H}_{17}-\text{H}_{18}/\text{H}_{16}} = 7,4$ Hz, 2H_{17}) ; 7,38 (2H, t, $J_{\text{H}_{18}-\text{H}_{17}/\text{H}_{19}} = 7,4$ Hz, 2H_{18}) ; 7,56 (2H, m, 2H_{16}) ; 7,75 (2H, d, $J_{\text{H}_{19}-\text{H}_{18}} = 7,4$ Hz, 2H_{19}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,9 ; 20,9 ; 21,1 ($4\times\text{CH}_3$ acétates) ; 28,3 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 28,5 (C_5) ; 34,6 ; 34,9 (C_2) ; 43,4 ; 44,3 ; 45,1 ; 45,3 (C_3 , C_4) ; 47,6 (C_{14}) ; 62,6 (C_{12}) ; 66,2 ; 66,3 ; 66,7 ; 67,2 ; 68,7 ; 69,2 ; 69,3 ; 69,8 (C_6 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{13}) ; 80,9 ; 81 ($\text{C-(CH}_3)_3$) ; 97,8 ; 97,9 (C_7) ; 120,1 (2C_{19}) ; 124,8 ; 125,0 (2C_{16}) ; 127,3 ; 127,8 (2C_{17} , 2C_{18}) ; 141,6 ; 144,2 (2C_{15} , 2C_{20}) ; 156,0 ; 156,1 (C=O carbamate) ; 169,9 ; 170,0 ; 170,2 ; 171,8 ($4\times\text{C=O}$ acétates, C_1).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 756,3231$; trouvé 756,3228 (0,4 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 778,3051$; trouvé 778,3056 (0,64 ppm).

HPLC: 26,2 min (MeOH/ H_2O (0,1% TFA) 80:20).

Monomère *O*-GalNAc **4.7**

La synthèse du monomère *O*-GalNAc **4.7** consiste à appliquer la procédure générale de protection d'amine par un Fmoc, en utilisant:

- Le monomère amine GalNAc **2.13** (1 éq, 0,67 mmol, 359 mg)
- Le Fmoc-Cl (2 éq, 1,35 mmol, 350 mg)
- Une solution de NaHCO_3 saturée (3,70 mL)
- Du 1,4-dioxane (2,40 mL)

Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt/Cyclohexane 95:5), le composé **4.7** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle (0,56 mmol, 422 mg) avec un rendement de 84%.

CCM: $R_f = 0,40$ (AcOEt/Cyclohexane 95:5).

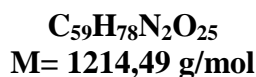
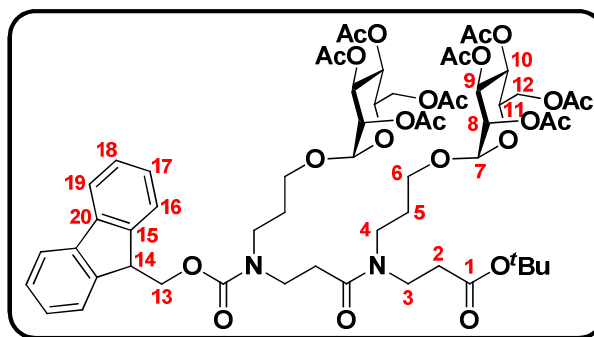
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3353 ; 3323 (ν N-H acétamide) ; 2979 ; 2927 (ν C_{sp^3} -H) ; 1747 ; 1728 ; 1700 ; 1695 ; 1679 (ν C=O esters, carbamate, acétamide) ; 1560 ; 1529 (δ N-H) ; 1479 ; 1458 ; 1451 (ν C=C aromatiques) ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1224 ; 1221 ; 1153 ; 1131 ; 1075 ; 1044 (ν C-O, ν C-N) ; 953 ; 739 ; 737 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (9H, m, $3 \times \text{CH}_3$ de l'ester de *tert*-butyle) ; 1,67-1,81 (2H, m, 2H_5) ; 1,93-2,19 (13H, m, $3 \times \text{CH}_3$ acétates, CH_3 acétamide, H_2) ; 2,45 (1H, m, H_2) ; 3,06-3,66 (6H, m, 2H_3 , 2H_4 , 2H_6) ; 4,03-4,22 (4H, m, H_{11} , 2H_{12} , H_{14}) ; 4,50 (2H, m, 2H_{13}) ; 4,60 (1H, m, H_8) ; 4,80 (1H, m, H_7) ; 5,13 (1H, dd, $J_{\text{H}9-\text{H}10} = 3,0 \text{ Hz}$ et $J_{\text{H}9-\text{H}8} = 11,7 \text{ Hz}$, H_9) ; 5,37 (1H, d, $J_{\text{H}10-\text{H}9} = 3,0 \text{ Hz}$, H_{10}) ; 6,19-6,79 (1H, m, NHAc) ; 7,32 (2H, t, $J_{\text{H}17-\text{H}16/\text{H}18} = 7,6 \text{ Hz}$, 2H_{17}) ; 7,39 (2H, t, $J_{\text{H}18-\text{H}17/\text{H}19} = 7,6 \text{ Hz}$, 2H_{18}) ; 7,55 (2H, m, 2H_{16}) ; 7,75 (2H, d, $J_{\text{H}19-\text{H}18} = 7,6 \text{ Hz}$, 2H_{19}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 23,0 ($3\times\text{CH}_3$ acétates, CH_3 acétamide) ; 27,6 (C_5) ; 28,0 ($3\times\text{CH}_3$ de l'ester de *tert*-butyle) ; 34,5 ; 34,6 (C_2) ; 42,3 ; 43,6 ; 44,0 ; 44,9 (C_3 , C_4) ; 47,3 ; 47,5 (C_8 , C_{14}) ; 61,9 ; 62,2 (C_{12}) ; 64,0 ; 65,1 (C_6) ; 66,7 ; 67,0 ; 67,3 ; 67,4 ; 68,1 ; 68,8 (C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{13}) ; 81,0 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,6 ; 97,7 (C_7) ; 120,0 (C_{19}) ; 124,6 (C_{16}) ; 127,0 (C_{17}) ; 127,7 (C_{18}) ; 141,4 ; 143,7 ; 143,8 ; 143,9 (2C_{15} , 2C_{20}) ; 156,0 ($\text{C}=\text{O}$ carbamate) ; 170,4 ; 170,6 ; 170,7 ; 171,0 ($3\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $\text{C}=\text{O}$ acétamide, C_1).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 755,3391$; trouvé 755,3402 (1,5 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 777,3205$; trouvé 777,3250 (5,8 ppm).

Plateforme β -dipeptotide *O*-Man 4.8



La synthèse de la plateforme β -dipeptotide *O*-mannosylée **4.8** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale d'hydrolyse d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **4.6** (1 éq, 0,63 mmol, 488 mg)
- Du TFA (4,40 mL)
- Du DCM (4,40 mL)

L'acide carboxylique est obtenu au bout d'1h15 d'agitation, sous forme d'une mousse jaune orangé de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique (méthode monomère), en utilisant:

- L'acide carboxylique formé ci-dessus (1 éq, 0,63 mmol)
- Le monomère amine mannose **2.12** (1 éq, 0,63 mmol, 338 mg)
- HATU (2 éq, 1,27 mmol, 482 mg)

- DIPEA (2,5 éq, 1,58 mmol, 0,28 mL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 5,50 mL et 2,30 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 17h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 99:1 puis 98:2), le dipeptotide glycosylé **4.8** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,57 mmol, 690 mg) avec un rendement de 90%.

CCM: $R_f = 0,50$ (DCM/MeOH 98:2).

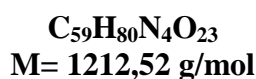
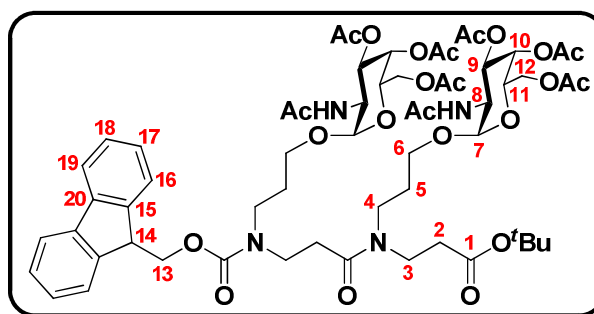
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2947 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1746 (ν C=O esters) ; 1698 ; 1643 (ν C=O amide et carbamate) ; 1479 ; 1450 (ν C=C aromatiques) ; 1440 ; 1422 ; 1368 (δ C-H alkyles) ; 1220 ; 1136 ; 1084 ; 1047 (ν C-O , ν C-N) ; 980 ; 743 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,57-1,83 (4H, m, 4H_5) ; 1,95-2,14 (24H, m, $8\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,30-2,60 (4H, m, 4H_2) ; 3,10-3,71 (12H, m, 4H_3 , 4H_4 , 4H_6) ; 3,96 (2H, m, 2H_{11}) ; 4,10 (2H, m, 2H_{12}) ; 4,27 (3H, m, 2H_{12} , H_{14}) ; 4,52 (2H, m, 2H_{13}) ; 4,77 (2H, m, 2H_7) ; 5,25 (6H, m, 2H_8 , 2H_9 , 2H_{10}) ; 7,30 (2H, m, 2H_{17}) ; 7,38 (2H, t, $J_{\text{H}18-\text{H}17/\text{H}19} = 7,5$ Hz, 2H_{18}) ; 7,57 (2H, d, $J_{\text{H}16-\text{H}17} = 7,5$ Hz, 2H_{16}) ; 7,75 (2H, d, $J_{\text{H}19-\text{H}18} = 7,5$ Hz, 2H_{19}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ($8\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,6 ; 27,9 ; 28,0 ; 28,3 ; 28,8 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, 2C_5) ; 31,7 ; 31,8 ; 31,9 ; 32,0 ; 33,8 ; 33,9 ; 34,8 ; 34,8 (2C_2) ; 42,3 ; 43,0 ; 43,3 ; 43,6 ; 44,5 ; 45,1 ; 45,4 (2C_3 , 2C_4) ; 47,3 (C_{14}) ; 62,4 (2C_{12}) ; 65,3 ; 66,0 ; 66,2 ; 66,5 ; 66,6 ; 66,9 ; 68,4 ; 68,4 ; 68,6 ; 68,9 ; 69,0 ; 69,4 ; 69,5 ; 69,5 (2C_6 , 2C_8 , 2C_9 , 2C_{10} , 2C_{11} , 2C_{13}) ; 82,2 ($\text{C-(CH}_3)_3$) ; 97,5 ; 97,7 (2C_7) ; 119,9 ; 124,7 ; 124,7 (2C_{16} , 2C_{19}) ; 127,0 ; 127,6 (2C_{17} , 2C_{18}) ; 141,3 ; 144,0 (2C_{15} , 2C_{20}) ; 155,8 ; 155,9 (C=O carbamate) ; 169,7 ; 169,7 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,6 ; 170,8 ; 171,2 ($8\times\text{C=O}$ acétates, C=O plateforme peptotide, C_1).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1215,4972$; trouvé 1215,4957 (1,23 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1237,4870$; trouvé 1237,4824 (3,72 ppm).

HPLC: 22,3 min (MeOH/ H_2O (0,1% TFA) 80:20).

Plateforme β -dipeptide *O*-GalNAc **4.9**

La synthèse de la plateforme β -dipeptide *O*-GalNAc **4.9** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **4.7** (1 éq, 0,47 mmol, 355 mg)
- Du TFA (3,40 mL)
- Du DCM (3,40 mL)

L'acide carboxylique est obtenu au bout d'1h15 d'agitation, sous forme d'une mousse jaune orangé de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique (méthode monomère), en utilisant:

- L'acide carboxylique formé ci-dessus (1 éq, 0,47 mmol)
- Le monomère amine GalNAc **2.13** (1 éq, 0,47 mmol, 251 mg)
- HATU (2 éq, 0,94 mmol, 358 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 1,18 mmol, 0,21 mL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 4,00 mL et 1,80 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 14h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 97:3), le dipeptide glycosylé **4.9** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,39 mmol, 480 mg) avec un rendement de 81%.

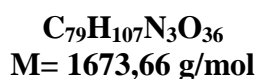
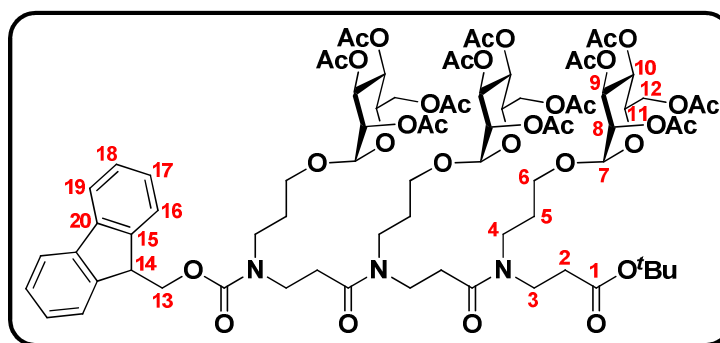
CCM: $R_f = 0,44$ (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3307 (ν N-H) ; 2953 (ν C_{sp^3} -H) ; 1745 ; 1715 ; 1676 ; 1648 (ν C=O esters, carbamate, amides) ; 1555 ; 1522 (δ N-H) ; 1479 (ν C=C aromatiques) ; 1426 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1153 ; 1132 ; 1047 ; 1044 (ν C-O, ν C-N) ; 944 ; 769 ; 745 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ de l'ester de *tert*-butyle) ; 1,49-1,84 (4H, m, 4H_5) ; 1,93-2,14 (24H, m, $6\times\text{CH}_3$ acétates, $2\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 2,26-2,71 (4H, m, 4H_2) ; 3,06-3,76 (12H, m, 4H_3 , 4H_4 , 4H_6) ; 3,98-4,23 (7H, m, 2H_{11} , 4H_{12} , H_{14}) ; 4,38-4,63 (4H, m, 2H_8 , 2H_{13}) ; 4,84 (2H, m, 2H_7) ; 5,13 (2H, m, 2H_9) ; 5,35 (2H, m, 2H_{10}) ; 6,34-7,10 (2H, m, $2\times\text{NHAc}$) ; 7,30 (2H, t, $J_{\text{H}17-\text{H}16/\text{H}18} = 7,4$ Hz, 2H_{17}) ; 7,38 (2H, t, $J_{\text{H}18-\text{H}17/\text{H}19} = 7,4$ Hz, 2H_{18}) ; 7,54 (2H, m, 2H_{16}) ; 7,75 (2H, d, $J_{\text{H}19-\text{H}18} = 7,4$ Hz, 2H_{19}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ; 22,9 ; 23,0 ; 23,1 ($6\times\text{CH}_3$ acétates, $2\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 27,4 ; 27,5 ; 27,6 ; 27,9 ; 28,0 ; 28,4 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,6 ; 31,9 ; 32,1 ($3\times\text{CH}_3$ de l'ester de *tert*-butyle, 2C_5) ; 33,9 ; 34,3 ; 34,8 ; 35,0 (2C_2) ; 41,9 ; 42,1 ; 42,4 ; 42,7 ; 42,8 ; 43,0 ; 43,2 ; 43,6 ; 43,8 ; 44,7 ; 44,8 ; 45,1 ; 45,2 ; 45,7 (2C_3 , 2C_4) ; 47,1 ; 47,3 ; 47,4 ; 47,5 ; 47,5 ; 47,6 (2C_8 , C_{14}) ; 61,7 ; 61,9 ; 62,0 ; 62,1 (2C_{12}) ; 64,1 ; 64,2 ; 64,3 ; 64,4 ; 64,9 ; 65,0 (2C_6) ; 66,5 ; 66,6 ; 66,8 ; 67,0 ; 67,1 ; 67,3 ; 67,3 ; 67,9 ; 68 ; 68,5 ; 68,6 ; 68,7 (2C_9 , 2C_{10} , 2C_{11} , C_{13}) ; 81,0 ; 81,7 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,4 ; 97,6 ; 97,6 (2C_7) ; 119,9 ; 120,0 (2C_{19}) ; 124,5 ; 124,6 (2C_{16}) ; 127,0 ; 127,1 (2C_{17}) ; 127,7 ; 127,8 (2C_{18}) ; 141,4 ; 143,7 ; 143,8 ; 143,9 ; 144,0 (2C_{15} , 2C_{20}) ; 155,9 ; 156,0 ; 156,2 ; 156,3 (C=O carbamate) ; 170,3 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 171,4 ($6\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $2\times\text{C}=\text{O}$ acétamides, C=O plateforme peptôïde, C_1).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1213,5292$; trouvé 1213,5251 (3,4 ppm).

Plateforme β -tripeptoïde *O*-Man 4.10

La synthèse de la plateforme β -tripeptoïde *O*-mannosylée **4.10** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale d'hydrolyse d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **4.8** (1 éq, 0,51 mmol, 614 mg)
- Du TFA (3,50 mL)
- Du DCM (3,50 mL)

L'acide carboxylique est obtenu au bout d'1h15 d'agitation, sous forme d'une mousse jaune orangé de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique (méthode monomère), en utilisant:

- L'acide carboxylique formé ci-dessus (1 éq, 0,51 mmol)
- Le monomère amine mannose **2.12** (1 éq, 0,51 mmol, 270 mg)
- HATU (2 éq, 1,01 mmol, 385 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 1,26 mmol, 0,22 mL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 4,50 mL et 1,90 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 18h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 98:2 puis 97:3), le tripeptoïde glycosylé **4.10** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,44 mmol, 738 mg) avec un rendement de 87%.

CCM: $R_f = 0,50$ (DCM/MeOH 97:3).

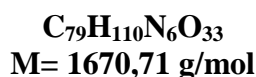
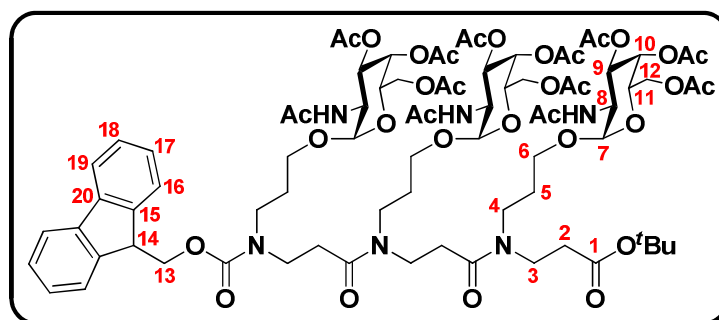
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2937 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 1749 (ν C=O esters) ; 1699 ; 1645 ; 1640 (ν C=O amides et carbamate) ; 1480 ; 1458 (ν C=C aromatiques) ; 1441 ; 1423 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1136 ; 1084 ; 1047 (ν C-O , ν C-N) ; 970 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,40 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle) ; 1,60-1,80 (6H, m, 6H_5) ; 1,91-2,15 (36H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,40-2,62 (6H, m, 6H_2) ; 3,10-3,70 (18H, m, 6H_3 , 6H_4 , 6H_6) ;) ; 3,94 (3H, m, 3H_{11}) ; 4,06 (3H, m, 3H_{12}) ; 4,25 (4H, m, 3H_{12} , H_{14}) ; 4,47 (2H, m, 2H_{13}) ; 4,75 (3H, m, 3H_7) ; 5,25 (9H, m, 3H_8 , 3H_9 , 3H_{10}) ; 7,29 (2H, m, 2H_{17}) ; 7,36 (2H, t, $J_{\text{H}18\text{-H}17/\text{H}19} = 7,5$ Hz, 2H_{18}) ; 7,56 (2H, d, $J_{\text{H}16\text{-H}17} = 7,5$ Hz, 2H_{16}) ; 7,73 (2H, d, $J_{\text{H}19\text{-H}18} = 7,5$ Hz, 2H_{19}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ($12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,5 ; 27,6 ; 28,0 ; 28,3 ; 28,4 ; 28,8 ($3\times\text{CH}_3$ ester de *tert*-butyle, 3C_5) ; 31,6 ; 31,7 ; 33,5 ; 33,8 ; 34,8 (3C_2) ; 43,0 ; 43,1 ; 43,6 ; 44,6 ; 44,8 ; 45,0 ; 45,1 ; 45,3 ; 45,5 ; 45,6 (2C_3 , 2C_4) ; 47,3 (C_{14}) ; 62,4 (3C_{12}) ; 65,2 ; 65,3 ; 66,1 ; 66,2 ; 66,3 ; 68,4 ; 68,9 ; 69,0 ; 69,1 ; 69,4 ; 69,5 (3C_6 , 3C_8 , 2C_9 , 3C_{10} , 3C_{11} , 3C_{13}) ; 81,3 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$) ; 97,5 ; 97,7 (3C_7) ; 120,0 ; 124,7 ; 124,7 ; 124,8 (3C_{16} , 3C_{19}) ; 127,0 ; 127,1 ; 127,7 (3C_{17} , 3C_{18}) ; 141,4 ; 144,1 (3C_{15} , 3C_{20}) ; 155,8 ; 155,9 (C=O carbamate) ; 169,7 ; 169,8 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,3 ; 170,6 ; 170,7 ; 171,0 ($12\times\text{C=O}$ acétates, $2\times\text{C=O}$ plateforme peptoïde, C_1).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 837,8395$; trouvé 837,8367 (3,34 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}/2 = 848,8305$; trouvé 848,8231 (8,72 ppm).

HPLC: 21,4 min (MeOH/ H_2O (0,1 % TFA) 80:20).

Plateforme β -tripeptoïde *O*-GalNAc **4.11**

La synthèse de la plateforme β -dipeptoïde *O*-GalNAc **4.11** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **4.9** (1 éq, 0,32 mmol, 392 mg)
- Du TFA (2,30 mL)
- Du DCM (2,30 mL)

L'acide carboxylique est obtenu au bout d'1h15 d'agitation, sous forme d'une mousse jaune orangé de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique (méthode monomère), en utilisant:

- L'acide carboxylique formé ci-dessus (1 éq, 0,32 mmol)
- Le monomère amine GalNAc **2.13** (1 éq, 0,32 mmol, 172 mg)
- HATU (2 éq, 0,65 mmol, 246 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,81 mmol, 0,14 mL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 2,80 mL et 1,20 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 20h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 96:4), le dipeptoïde glycosylé **4.11** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,23 mmol, 380 mg) avec un rendement de 75%.

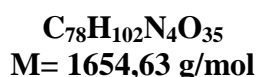
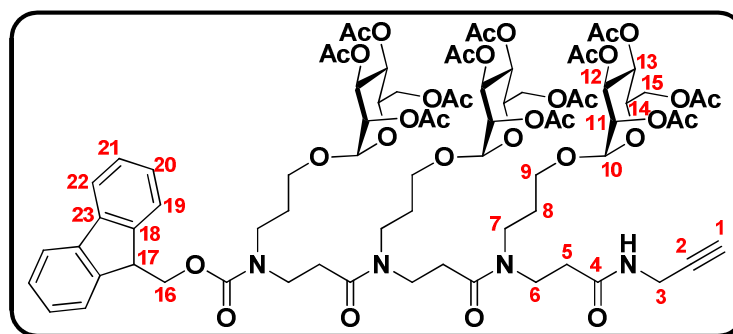
CCM: $R_f = 0,56$ (DCM/MeOH 94:6).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3342 (ν N-H) ; 2954 (ν C_{sp3}-H) ; 1747 ; 1703 ; 1680 ; 1634 ; 1626 (ν C=O esters, carbamate, amides, acétamides) ; 1555 ; 1531 (δ N-H) ; 1480 ; 1452 (ν C=C) ; 1435 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1155 ; 1131 ; 1047 ; 1044 (ν C-O, ν C-N) ; 949 ; 734 (δ C-H aromatique).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ de l'ester de *tert*-butyle) ; 1,72-2,13 (42H, m, $9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides, 6H₅) ; 2,18-2,65 (6H, m, 6H₂) ; 3,06-3,69 (18H, m, 6H₃, 6H₄, 6H₆) ; 4,04-4,27 (10H, m, 3H₁₁, 6H₁₂, H₁₄) ; 4,47-4,62 (5H, m, 3H₈, 2H₁₃) ; 4,88 (3H, m, 3H₇) ; 5,13 (3H, m, 3H₉) ; 5,36 (3H, m, 3H₁₀) ; 6,23-7,09 (3H, m, $3\times\text{NHAc}$) ; 7,29 (2H, t, $J_{\text{H}17-\text{H}16/\text{H}18} = 7,2$ Hz, 2H₁₇) ; 7,38 (2H, t, $J_{\text{H}18-\text{H}17/\text{H}19} = 7,2$ Hz, 2H₁₈) ; 7,53 (2H, m, 2H₁₆) ; 7,74 (2H, d, $J_{\text{H}19-\text{H}18} = 7,2$ Hz, 2H₁₉).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,4 ; 20,5 ; 20,6 ; 20,7 ; 22,8 ; 22,8 ; 22,9 ; 23,0 ($9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 27,7 ; 28,1 ; 29,3 ; 29,4 ; 31,8 ; 31,9 ; 32,1 ; 32,1 ; 32,2 ; 32,3 ($3\times\text{CH}_3$ de l'ester de *tert*-butyle, 3C₅) ; 34,1 ; 34,2 ; 34,9 ; 35,1 (3C₂) ; 42,3 ; 42,4 ; 42,5 ; 43,2 ; 43,4 ; 43,7 ; 43,8 ; 45,0 ; 45,2 ; 45,4 ; 45,5 ; 45,6 ; 45,8 ; 45,9 (3C₃, 3C₄) ; 47,4 ; 47,5 ; 47,7 ; 47,8 (3C₈, C₁₄) ; 61,9 ; 62,0 ; 62,1 ; 62,2 (3C₁₂) ; 64,6 ; 64,7 ; 65,4 (3C₆) ; 66,8 ; 66,9 ; 67,0 ; 67,3 ; 67,4 ; 67,5 ; 68,1 ; 68,2 ; 68,3 ; 68,6 (3C₉, 3C₁₀, 3C₁₁, C₁₃) ; 81,1 ; 81,7 (C-(CH₃)₃) ; 97,9 ; 98,0 (3C₇) ; 120,0 (2C₁₉) ; 124,5 ; 124,6 (2C₁₆) ; 127,1 (2C₁₇) ; 127,7 ; 127,8 (2C₁₈) ; 141,5 ; 143,9 ; 143,9 ; 144,0 (2C₁₅, 2C₂₀) ; 156,1 ; 156,2 ; 156,3 (C=O carbamate) ; 170,2 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 171,2 ; 171,3 ; 171,4 ($9\times\text{C=O}$ acétates, $3\times\text{C=O}$ acétamides, $2\times\text{C=O}$ plateforme peptoïde, C₁).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 836,3630$; trouvé 836,3607 (2,8 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}/2 = 855,3409$; trouvé 855,3317.

Plateforme β -tripeptoïde *O*-Man 4.12

La synthèse de la plateforme β -tripeptoïde *O*-mannosylée **4.12** se déroule en deux temps. La première partie consiste à appliquer la procédure générale d'hydrolyse d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **4.10** (1 éq, 0,19 mmol, 328 mg)
- Du TFA (1,40 mL)
- Du DCM (1,40 mL)

L'acide carboxylique est obtenu au bout d'1h15 sous forme d'une huile orangée de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique, en utilisant:

- L'acide carboxylique formé ci-dessus (1 éq, 0,19 mmol)
- La propargylamine (3 éq, 5,89 mmol, 38 μL)
- HATU (2 éq, 0,39 mmol, 149 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,49 mmol, 86 μL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 4,20 mL et 1,80 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 18h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (DCM/MeOH 97:3), le tripeptoïde glycosylé **4.12** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,17 mmol, 278 mg) avec un rendement de 86%.

CCM: $R_f = 0,60$ (DCM/MeOH 95:5).

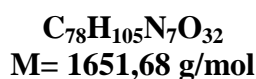
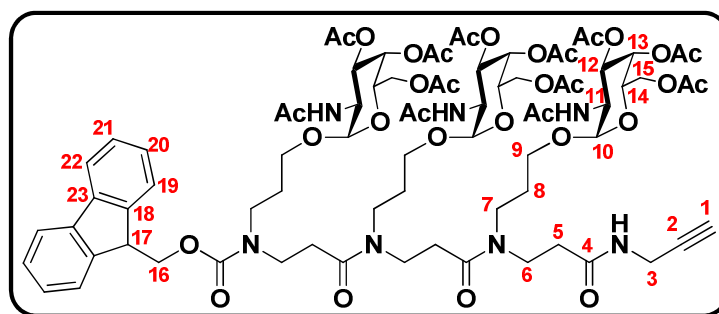
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2941 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 2360 (ν $\text{C}\equiv\text{C}$) ; 1744 (ν $\text{C}=\text{O}$ esters) ; 1693 ; 1672 ; 1635 (ν $\text{C}=\text{O}$ amides, carbamate) ; 1477 ; 1456 (ν $\text{C}=\text{C}$ aromatiques) ; 1445 ; 1426 ; 1369 (δ C-H alkyles) ; 1219 ; 1135 ; 1083 ; 1047 (ν C-O , ν C-N) ; 979 ; 747 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,56-1,82 (6H, m, 6H_8) ; 1,94-2,12 (36H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,20 (1H, m, H_1) ; 2,45-2,70 (6H, m, 6H_5) ; 3,15-3,70 (18H, m, 6H_6 , 6H_7 , 6H_9) ; 3,94 (5H, m, 2H_3 , 3H_{14}) ; 4,07 (3H, m, 3H_{15}) ; 4,25 (4H, m, 3H_{15} , H_{17}) ; 4,47 (2H, m, 2H_{16}) ; 4,75 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,22 (9H, m, 3H_{11} , 3H_{12} , 3H_{13}) ; 7,22 ($\text{NH-CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 7,29 (2H, m, 2H_{20}) ; 7,36 (2H, t, $J_{\text{H}21\text{-H}20/\text{H}22} = 7,1$ Hz, 2H_{21}) ; 7,56 (2H, d, $J_{\text{H}19\text{-H}20} = 7,1$ Hz, 2H_{19}) ; 7,73 (2H, d, $J_{\text{H}22\text{-H}21} = 7,1$ Hz, 2H_{22}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ($12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,4 ; 27,6 ; 28,2 ; 28,3 ; 28,7 ; 28,8 ; 28,9 (C_3 , 3C_8) ; 31,1 ; 31,3 ; 31,6 ; 32,0 ; 32,2 ; 34,4 ; 34,5 ; 35,1 ; 35,7 ; 35,8 ; 35,9 (3C_5) ; 43,0 ; 43,2 ; 43,3 ; 43,5 ; 43,8 ; 44,6 ; 44,9 ; 45,0 ; 45,2 ; 45,7 (3C_6 , 3C_7) ; 47,2 ; 47,3 (C_{17}) ; 62,3 (3C_{15}) ; 65,0 ; 65,1 ; 65,2 ; 65,8 ; 65,9 ; 66,0 ; 66,1 ; 66,2 ; 66,7 ; 68,4 ; 68,5 ; 68,6 ; 68,7 ; 68,9 ; 69,1 ; 69,3 ; 69,4 ; 69,5 ; 71,0 ; 71,2 (C_1 , 3C_9 , 3C_{11} , 3C_{12} , 3C_{13} , 3C_{14} , C_{16}) ; 81,0 (C_2) ; 97,3 ; 97,4 ; 97,5 (3C_{10}) ; 119,9 ; 124,6 ; 124,8 (2C_{19} , 2C_{22}) ; 127,0 ; 127,1 ; 127,6 (2C_{20} , 2C_{21}) ; 141,3 ; 144,0 (2C_{18} , 2C_{23}) ; 155,9 ($\text{C}=\text{O}$ carbamate) ; 169,6 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,5 ; 170,6 ; 171,1 ; 171,2 ($12\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptöide, C_4).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 828,3241$; trouvé 828,3207 (4,1 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}/2 = 839,3151$; trouvé 839,3201 (5,96 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}/2 = 847,3020$; trouvé 847,2952 (8,03 ppm).

HPLC: 12,9 min (MeOH/ H_2O (0,1 % TFA) 80:20).

Plateforme β -tripeptoïde *O*-GalNAc **4.13**

La synthèse de la plateforme β -tripeptoïde *O*-GalNAc **4.13** se déroule en deux étapes. La première étape consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'acide carboxylique sous forme d'ester de *tert*-butyle, en utilisant:

- Le composé **4.11** (1 éq, 0,09 mmol, 151 mg)
- Du TFA (0,70 mL)
- Du DCM (0,70 mL)

L'acide carboxylique est obtenu au bout d'1h15 d'agitation, sous forme d'une mousse jaune orangé de manière quantitative. La deuxième partie de la synthèse consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique, en utilisant:

- L'acide carboxylique formé ci-dessus (1 éq, 0,09 mmol)
- La propargylamine (3 éq, 0,27 mmol, 17 μL)
- HATU (2 éq, 0,18 mmol, 69 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,23 mmol, 39 μL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 1,40 mL et 0,60 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 18h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 94:6), le dipeptoïde glycosylé **4.13** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,08 mmol, 138 mg) avec un rendement de 95%.

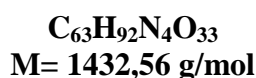
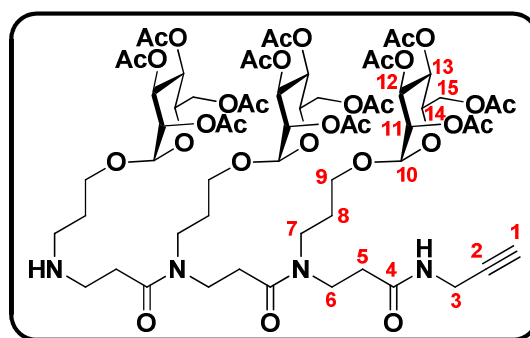
CCM: $R_f = 0,40$ (DCM/MeOH 96:4).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3289 (ν N-H) ; 2948 (ν C_{sp^3} -H) ; 2371 (ν $\text{C}\equiv\text{C}$) ; 1745 ; 1675 ; 1671 ; 1648 ; 1637 (ν $\text{C}=\text{O}$ esters, carbamate, amides) ; 1570 (δ N-H) ; 1541 ; 1478 ; 1456 (ν $\text{C}=\text{C}$ aromatiques) ; 1424 ; 1371 (δ C-H alkyles) ; 1224 ; 1166 ; 1131 ; 1073 ; 1047 (ν C-O, ν C-N) ; 948 ; 923 ; 742 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,70-2,21 (43H, m, $9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides, H_1 , 6H_8) ; 2,24-2,68 (6H, m, 6H_5) ; 3,11-3,72 (18H, m, 6H_6 , 6H_7 , 6H_9) ; 3,96-4,26 (12H, m, 2H_3 , 3H_{14} , 6H_{15} , H_{17}) ; 4,56 (5H, m, 3H_{11} , 2H_{16}) ; 4,86 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,14 (3H, m, 3H_{12}) ; 5,35 (3H, m, 3H_{13}) ; 6,54-7,18 (4H, m, $3\times\text{NHAc}$, $\text{NH}-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 7,27 (2H, m, 2H_{20}) ; 7,37 (2H, m, 2H_{21}) ; 7,53 (2H, m, 2H_{19}) ; 7,73 (2H, m, 2H_{22}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,5 ; 20,6 ; 20,7 ; 22,8 ; 22,9 ($9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 27,7 ; 27,8 ; 29,0 ; 29,1 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 31,8 ; 32,1 ; 32,2 ; 32,5 (C_3 , 3C_8) ; 34,5 ; 34,6 ; 34,7 ; 34,8 ; 36,0 ; 36,1 ; 36,2 (3C_5) ; 42,8 ; 42,9 ; 43,0 ; 43,3 ; 43,4 ; 43,5 ; 45,7 ; 45,8 (3C_6 , 3C_7) ; 47,4 ; 47,8 ; 47,9 (3C_{11} , C_{17}) ; 62,0 ; 62,1 ; 62,2 (3C_{15}) ; 64,2 ; 64,3 ; 64,6 ; 64,7 ; 64,8 ; 65,0 ; 65,2 ; 65,3 (3C_9) ; 66,7 ; 67,0 ; 67,1 ; 67,3 ; 67,4 ; 68,1 ; 68,2 ; 68,3 ; 68,5 ; 68,6 (3C_{12} , 3C_{13} , 3C_{14} , C_{16}) ; 71,3 ; 71,4 (C_1) ; 80,6 (C_2) ; 97,7 ; 97,8 (3C_{10}) ; 120,0 (2C_{22}) ; 124,5 ; 124,6 (2C_{19}) ; 127,1 (2C_{20}) ; 127,8 (2C_{21}) ; 141,5 ; 143,9 (2C_{18} , 2C_{23}) ; 156,1 ($\text{C}=\text{O}$ carbamate) ; 170,0 ; 170,2 ; 170,3 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,9 ; 171,4 ; 171,5 ($9\times\text{C}=\text{O}$ acétates, $3\times\text{C}=\text{O}$ acétamides, $2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptidique, C_4).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 826,8475$; trouvé 826,8450 (3 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}/2 = 845,8254$; trouvé 845,8209 (5,3 ppm).

Plateforme β -tripeptoïde *O*-Man 4.14

La synthèse de la plateforme β -tripeptoïde *O*-mannosylée **4.14** consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'amine protégée par un Fmoc, en utilisant:

- Le composé **4.12** (1 éq, 0,04 mmol, 60 mg)
- Et_2NH (0,50 mL)
- CH_3CN (1,00 mL)

Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 94:6, 92:8 puis 90:10), l'amine **4.14** est obtenue sous forme d'une huile jaune pâle (0,04 mmol, 51 mg) de manière quantitative.

CCM: $R_f = 0,22$ (DCM/MeOH 95:5).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 2954 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 2360 (ν $\text{C}\equiv\text{C}$) ; 1744 (ν C=O esters) ; 1674 ; 1668 (ν C=O amides) ; 1550 (δ N-H) ; 1452 ; 1432 ; 1370 (δ C-H alkyles) ; 1223 ; 1135 ; 1084 ; 1047 (ν C-O , ν C-N).

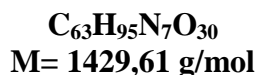
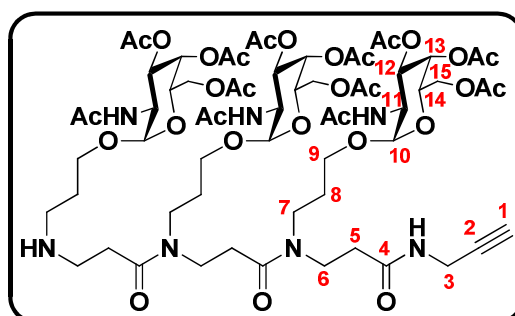
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,81 (6H, m, 6H_8) ; 1,94-2,11 (36H, m, $12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 2,20 (2H, m, H_1 , NH plateforme β -tripeptoïde) ; 2,49-3,02 (6H, m, 6H_5) ; 3,08-3,77 (18H, m, 6H_6 , 6H_7 , 6H_9) ; 3,95 (5H, m, 2H_3 , 3H_{14}) ; 4,07 (3H, m, 3H_{15}) ; 4,25 (3H, m, 3H_{15}) ; 4,80 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,22 (9H, m, 3H_{11} , 3H_{12} , 3H_{13}) ; 7,75 (1H, m, $\text{NH-CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ($12\times\text{CH}_3$ acétates) ; 27,1 ; 27,2 ; 27,5 ; 28,6 ; 28,7 ; 28,8 ; 29,6 (C_3 , 3C_8) ; 31,7 ; 34,3 ; 34,6 ; 35,0 ; 35,4 ; 35,5 (3C_5) ; 43,0 ; 43,5 ; 44,1 ; 44,8 ; 45,1 ; 45,5 ; 46,3 ; 46,4 ; 47,1 (3C_6 , 3C_7) ; 62,4 (3C_{15}) ; 64,7 ; 64,7 ; 64,8 ; 65,4 ; 65,5 ;

65,6 ; 65,9 ; 66,0 ; 66,4 ; 66,5 ; 68,4 ; 68,5 ; 68,6 ; 68,7 ; 68,9 ; 69,0 ; 69,2 ; 69,2 ; 69,3 ; 69,4 ; 69,4 ; 69,5 ; 70,8 ; 71,0 (C_1 , $3C_9$, $3C_{11}$, $3C_{12}$, $3C_{13}$, $3C_{14}$) ; 80,0 ; 80,1 (C_2) ; 97,2 ; 97,3 ; 97,4 ; 97,5 ($3C_{10}$) ; 169,5 ; 169,6 ; 169,7 ; 169,8 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,1 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,2 ; 171,4 ; 171,5 ($12 \times C=O$ acétates, $2 \times C=O$ plateforme peptoidé, C_4).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[M+2H]^{2+}/2 = 717,2900$; trouvé 717,2973 (10,18 ppm).

Plateforme β -tripeptide *O*-GalNAc **4.15**



La synthèse de la plateforme β -tripeptide *O*-GalNAc **4.15** consiste à appliquer la procédure générale de déprotection d'amine protégée par un Fmoc, en utilisant:

- Le composé **4.13** (1 éq, 0,04 mmol, 61,6 mg)
- Et_2NH (0,50 mL)
- CH_3CN (1,00 mL)

Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: DCM/MeOH 90:10 puis 88:12), l'amine **4.15** est obtenue sous forme d'une huile jaune pâle (0,04 mmol, 53 mg) de manière quantitative.

CCM: $R_f = 0,30$ (DCM/MeOH : 90:10).

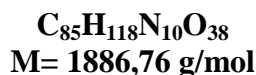
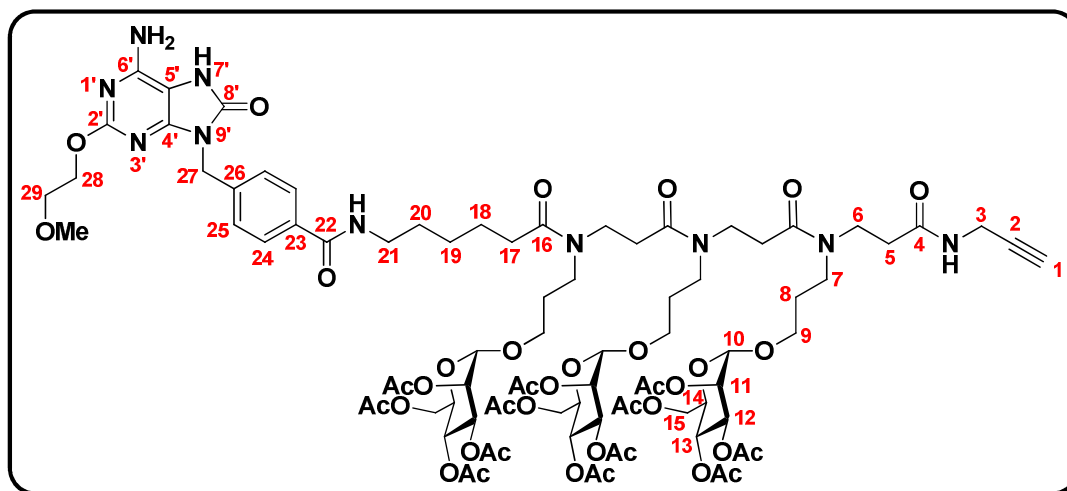
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3262 (ν N-H) ; 2914 (ν C_{sp^3} -H) ; 2378 (ν $C \equiv C$, faible) ; 1746 ; 1673 ; 1654 ; 1648 ; 1637 (ν $C=O$ esters, amides) ; 1577 ; 1539 ; 1528 (δ N-H) ; 1451 ; 1430 ; 1372 (δ C-H alkyles) ; 1220 ; 1223 ; 1167 ; 1170 ; 1133 ; 1142 ; 1048 ; 1037 (ν C-O, ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,73-2,15 (45H, m, $9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides, H_1 , H_5 , 6H_8 , NH plateforme β -tripeptoïde) ; 2,18-2,92 (5H, m, 5H_5) ; 3,10-4,05 (20H, m, 2H_3 , 6H_6 , 6H_7 , 6H_9) ; 4,07-4,47 (9H, m, 3H_{14} , 6H_{15}) ; 4,59 (3H, m, 3H_{11}) ; 4,92 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,12 (3H, m, 3H_{12}) ; 5,36 (3H, m, 3H_{13}) ; 6,67-8,00 (4H, m, $3\times\text{NHAc}$, $\text{NH-CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,6 ; 20,7 ; 20,8 ; 20,9 ; 22,8 ; 22,8 ; 22,9 ; 23,0 ; 23,1 ($9\times\text{CH}_3$ acétates, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 27,5 ; 27,6 ; 28,6 ; 28,7 ; 29,0 ; 29,1 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,6 (C_3 , 3C_8) ; 31,8 ; 32,1 ; 35,1 ; 35,1 ; 35,2 (3C_5) ; 42,3 ; 42,4 ; 43,8 ; 43,9 ; 44,0 ; 44,1 ; 45,4 ; 45,6 ; 45,8 ; 47,2 ; 47,3 ; 47,6 ; 48,8 (3C_6 , 3C_7 , 3C_{11}) ; 61,7 ; 61,9 ; 62,0 ; 62,1 ; 62,2 ; 62,4 ; 62,5 ; 64,5 ; 64,6 ; 65,7 (3C_9 , 3C_{15}) ; 66,4 ; 66,6 ; 66,7 ; 67,1 ; 67,2 ; 67,3 ; 67,4 ; 68,0 ; 68,2 ; 68,3 (3C_{12} , 3C_{13} , 3C_{14}) ; 71,3 ; 71,5 (C_1) ; 80,9 ; 81,0 (C_2) ; 97,5 ; 97,6 (3C_{10}) ; 170,2 ; 170,3 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,0 ; 171,1 ; 171,2 ($9\times\text{C=O}$ acétates, $3\times\text{C=O}$ acétamides, $2\times\text{C=O}$ plateforme peptoïde, C_4).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 715,8135$; trouvé 715,8030 ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}/2 = 726,8044$; trouvé 726,7972 (10 ppm).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptoïde *O*-Man 4.16



La synthèse de l'édifice *O*-mannosylé **4.16** consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique, en utilisant:

- L'hétérocycle aromatique **3.11** (1 éq, 0,023 mmol, 10,7 mg)
- La plateforme β -tripeptoïde *O*-mannose **4.14** (1 éq, 0,023 mmol, 32,4 mg)

- HATU (2 éq, 0,045 mmol, 17,2 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,057 mmol, 10 μ L)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 1,05 mL et 0,45 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 40h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: AcOEt/MeOH 90:10 puis 85:15), l'édifice glycosylé **4.16** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (0,012 mmol, 22 mg) avec un rendement de 50%.

CCM: $R_f = 0,31$ (AcOEt/MeOH 85:15).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3355 ; 3333 (ν N-H) ; 2957 ; 2924 (ν C_{sp^3} -H) ; 1746 ; 1647 ; 1644 ; 1618 (ν C=O urée aromatique, esters, amides) ; 1575 ; 1540 ; 1458 (ν C=C et C=N, δ N-H) ; 1440 ; 1419 ; 1370 ; 1342 (δ C-H alkyles) ; 1225 ; 1134 ; 1090 ; 1047 (ν C-O, ν C-N) ; 932 ; 899 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,58-1,88 (12H, m, 6H₈, 2H₁₈, 2H₁₉, 2H₂₀) ; 1,95-2,15 (39H, m, 12 \times CH₃ acétates, H₁, 2H₁₇) ; 2,19-2,71 (6H, m, 6H₅) ; 3,27-3,76 (25H, m, 6H₆, 6H₇, 6H₉, 2H₂₁, 2H₂₈ ou 2H₂₉, O-CH₃) ; 3,90-4,01 (5H, m, 2H₃, 3H₁₄) ; 4,10 (3H, m, 3H₁₅ ou 3H_{15'}) ; 4,28 (3H, dd, $J_{\text{H15 ou H15'-H14}} = 4,8$ Hz et $J_{\text{H15-H15'}} = 12,2$ Hz, 3H₁₅ ou 3H_{15'}) ; 4,41 (2H, m, 2H₂₈ ou 2H₂₉) ; 4,81 (3H, m, 3H₁₀) ; 5,00 (2H, m, 2H₂₇) ; 5,17-5,32 (9H, m, 3H₁₁, 3H₁₂, 3H₁₃) ; 5,82 (2H, m, NH₂) ; 7,39-7,88 (6H, m, 2H₂₄, 2H₂₅, NH espaceur, NH-CH₂C \equiv H) ; 10,10 (1H, m, NH cyclique).

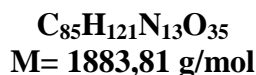
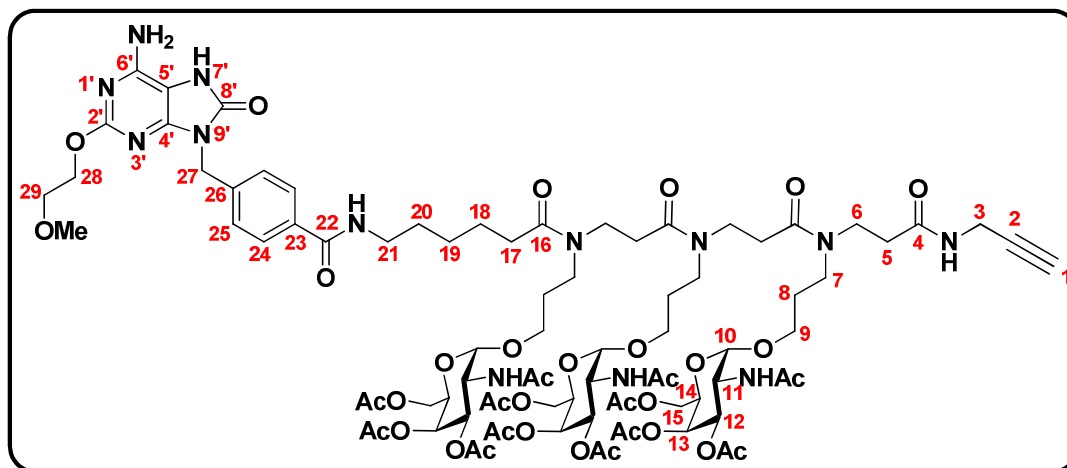
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 20,9 ; 21,0 ; 21,1 ; 21,2 (12 \times CH₃ acétates) ; 27,6 ; 27,7 ; 27,8 ; 28,9 ; 29,0 ; 29,1 ; 29,2 ; 29,3 ; 29,9 ; 30,0 (C₃, C₈, C₁₈, C₁₉, C₂₀) ; 31,3 ; 32,2 ; 33,5 ; 34,6 ; 36,8 (3C₅, C₁₇) ; 42,9 ; 43,0 ; 43,2 ; 43,3 ; 43,4 ; 43,5 ; 43,6 ; 44,2 ; 44,6 ; 45,7 ; 46,8 (3C₆, 3C₇, C₂₁, C₂₇) ; 59,2 (O-CH₃) ; 62,7 (3C₁₅) ; 65,2 ; 65,3 ; 66,1 ; 66,2 ; 66,3 ; 66,5 ; 68,7 ; 68,8 ; 68,9 ; 69,0 ; 69,2 ; 69,3 ; 69,4 ; 69,5 ; 69,6 ; 69,7 ; 69,8 ; 69,9 (3C₉, 3C₁₁, 3C₁₂, 3C₁₃, 3C₁₄, C₂₈ ou C₂₉) ; 70,9 (C₂₈ ou C₂₉) ; 71,4 (C₁) ; 80,0 (C₂) ; 97,7 ; 97,8 ; 97,9 (3C₁₀) ; 99,5 (C_{5'}) ; 127,7 ; 127,8 ; 128,3 ; 128,5 (2C₂₄, 2C₂₅) ; 134,4 ; 135,0 ; 139,8 ; 140,1 (C₂₃, C₂₆) ; 144,2 ; 148,2 ; 153,5 ; 161,0 (C_{2'}, C_{4'}, C_{6'}, C_{8'}) ; 169,8 ; 169,9 ; 170,0 ; 170,2 ; 170,3 ; 170,4 ; 170,5 ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,0 (12 \times C=O acétates, 2 \times C=O plateforme peptöide, C₄, C₁₆, C₂₂).

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 944,3882$; trouvé 944,3833 (5,2 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}/2 = 963,3662$; trouvé 963,3616 (4,8 ppm).

$[\alpha] = +201$ ($T = 25^\circ\text{C}$, $c = 0,075$, CHCl_3).

HPLC: $T_r = 11,8$ min (MeOH/H₂O (avec 0,1% TFA) 70:30).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptide *O*-GalNAc **4.17**



La synthèse de l'édifice *O*-GalNAc **4.17** consiste à appliquer la procédure générale de couplage peptidique, en utilisant:

- L'hétérocycle aromatique **3.11** (1 éq, 0,022 mmol, 10,4 mg)
- La plateforme β -tripeptide *O*-GalNAc **4.15** (1 éq, 0,022 mmol, 31,5 mg)
- HATU (2 éq, 0,044 mmol, 17 mg)
- DIPEA (2,5 éq, 0,051 mmol, 10 μL)
- DCM/DMF (70:30) soit respectivement 1,05 mL et 0,45 mL

Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous argon pendant 40h. Après traitement du milieu (détaillé dans la procédure générale) et purification du produit brut par chromatographie flash sur gel de silice (gradient: AcOEt/MeOH 85:15 puis 80:20), l'édifice glycosylé **4.17** est obtenu sous forme d'une mousse jaune claire (0,011 mmol, 20 mg) avec un rendement de 48%.

CCM: $R_f = 0,24$ (AcOEt/MeOH 80:20).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3306-3230 (ν N-H) ; 2960 ; 2923 ; 2853 (ν C_{sp3}-H) ; 2354 (ν C \equiv CH) ; 1745 ; 1731 ; 1648 ; 1639 ; 1615 (ν C=O urée aromatique, esters, amides) ; 1571 ; 1546 ; 1466 (ν C=C

et C=N, δ N-H) ; 1426 ; 1415 ; 1371 ; 1343 (δ C-H alkyles) ; 1229 ; 1162 ; 1130 ; 1129 ; 1075 ; 1045 (v C-O, v C-N) ; 781 (δ C-H aromatiques).

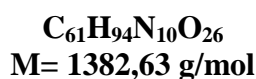
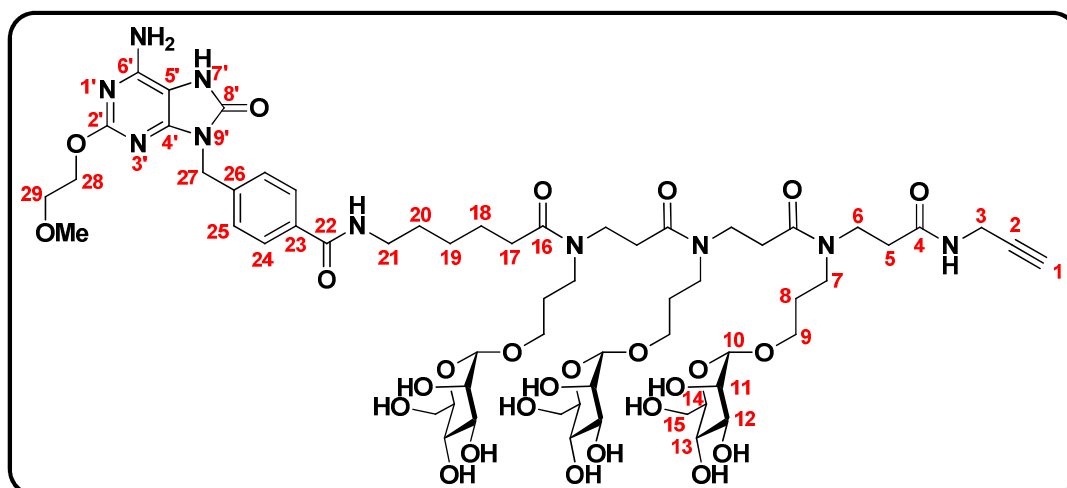
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,39-1,88 (12H, m, 6H₈, 2H₁₈, 2H₁₉, 2H₂₀) ; 1,94-2,16 (39H, m, 9 \times CH₃ acétates, 3 \times CH₃ acétamides, H₁, 2H₁₇) ; 2,30-2,68 (6H, m, 6H₅, 2H₁₄) ; 3,30-3,74 (25H, m, 6H₆, 6H₇, 6H₉, 2H₂₁, 2H₂₈ ou 2H₂₉, O-CH₃) ; 3,94-4,19 (11H, m, 2H₃, 3H₁₄, 6H₁₅) ; 4,43 (2H, m, 2H₂₈ ou 2H₂₉) ; 4,58 (3H, m, 3H₁₁) ; 4,83-5,04 (5H, m, 3H₁₀, 2H₂₇) ; 5,09-5,22 (3H, m, 3H₁₂) ; 5,38 (3H, m, 3H₁₃) ; 5,76 (2H, m, NH₂) ; 6,86-7,72 (9H, m, 2H₂₄, 2H₂₅, NH espaceur, 3 \times NH acétamides, NH-CH₂C \equiv H) ; 10,16 (1H, m, NH cyclique).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 21,0 ; 23,1 ; 23,2 ; 23,3 (9 \times CH₃ acétates, 3 \times CH₃ acétamides) ; 28,2 ; 28,3 (3 \times CH₃ ester de *tert*-butyle) ; 29,2 ; 29,3 ; 29,4 ; 29,5 ; 29,6 ; 29,7 ; 29,8 ; 29,9 ; 30,0 ; 30,1 ; 30,3 ; 30,5 ; 32,1 ; 32,2 ; 34,2 ; 36,5 (C₃, 3C₅, 3C₈, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀) ; 43,1 ; 43,3 ; 43,4 ; 45,2 ; 46,7 ; 46,8 (3C₆, 3C₇, C₂₁, C₂₇) ; 47,6 ; 47,7 ; 47,8 ; 47,9 ; 48,0 ; 48,1 ; 48,2 (3C₁₁) ; 59,2 (O-CH₃) ; 62,1 ; 62,2 ; 62,3 ; 62,4 ; 62,5 (3C₁₅) ; 64,7 ; 65,1 ; 65,7 ; 66,5 ; 66,6 (3C₉, C₂₈ ou C₂₉) ; 66,8 ; 67,4 ; 67,5 ; 67,6 ; 68,2 ; 68,3 ; 68,4 ; 68,5 (3C₁₂, 3C₁₃, 3C₁₄) ; 70,9 ; 71,6 ; 72,8 (C₁, C₂₈ ou C₂₉) ; 80,8 (C₂) ; 97,0 (C₅) ; 97,8 ; 97,9 ; 98,0 ; 98,1 (3C₁₀) ; 127,6 ; 127,7 ; 128,5 ; 128,6 (2C₂₄, 2C₂₅) ; 134,4 ; 139,7 (C₂₃, C₂₆) ; 144,8 ; 150,0 ; 153,5 ; 160,1 (C₂, C₄, C₆, C₈) ; 170,6 ; 170,7 ; 170,8 ; 170,9 ; 171,0 ; 171,1 ; 171,2 ; 171,3 ; 171,4 ; 171,5 ; 171,6 ; 171,7 ; 171,8 (9 \times C=O acétates, 3 \times C=O acétamides, 2 \times C=O plateforme peptoïde, C₄, C₁₆, C₂₂).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 942,9122$; trouvé 942,9157 (3,7 ppm).

$[\alpha]$ = +208 (T = 30°C, c = 0,0625, CHCl₃).

HPLC: 6,5 min (MeOH/H₂O (avec 0,1% TFA) 70:30).

Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptide *O*-Man(OH) **4.18**

Une solution contenant l'édifice *O*-mannosylé **4.16** (0,0078 mmol, 14,7 mg) dilué dans 2,20 mL de MeOH anhydre, est traitée par 0,21 mL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH= 8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H^+). La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **4.18** sous forme de solide blanc (0,0078 mmol, 10,8 mg) de manière quantitative.

CCM: $R_f = 0,41$ (Propanol/ H_2O 70:30).

IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3532-3120 (ν NH, OH) ; 2924 ; 2855 (ν $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$) ; 2359 (ν $\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 1727 ; 1707 ; 1663 ; 1617 (ν $\text{C}=\text{O}$ urée aromatique, amides) ; 1564 ; 1465 (ν $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{N}$ aromatiques) ; 1419 ; 1343 (δ C-H alkyles) ; 1200 ; 1132 ; 1062 ; 1030 ; 1028 (ν C-O , ν C-N) ; 972 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1,57-1,71 (6H, m, 2H_{18} , 2H_{19} , 2H_{20}) ; 1,77-1,92 (6H, m, 6H_8) ; 2,35-2,84 (9H, m, H_1 , 6H_5 , 2H_{17}) ; 3,36-3,97 (45H, 2H_3 , 6H_6 , 6H_7 , 6H_9 , 3H_{11} , 3H_{12} , 3H_{13} , 3H_{14} , 6H_{15} , 2H_{21} , 2H_{28} ou 2H_{29} , O-CH_3) ; 4,41 (2H, m, 2H_{28} ou 2H_{29}) ; 4,74 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,04 (2H, s, 2H_{27}) ; 7,46 (2H, d, $J_{\text{H}25\text{-H}24} = 8,1 \text{ Hz}$, 2H_{25}) ; 7,78 (2H, d, $J_{\text{H}24\text{-H}25} = 7,7 \text{ Hz}$, 2H_{24}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 26,2 ; 27,8 ; 28,6 ; 28,7 ; 29,5 ; 29,6 ; 30,0 ; 30,1 ; 30,2 ; 30,3 ; 30,5 ; 30,6 ; 30,8 (C_3 , 3C_8 , C_{18} , C_{19} , C_{20}) ; 32,3 ; 33,1 ; 33,9 ; 34,0 ; 35,1 ; 35,2 (3C_5 , C_{17}) ; 40,8 ; 40,9 ; 43,9 ; 44,0 ; 44,2 ; 44,3 ; 45,6 ; 47,0 ; 47,2 ; 59,2 ; 63,0 ; 65,3 ; 65,4 ; 65,5 ; 66,2 ; 66,3 ; 67,5 ; 68,7 ; 68,8 ; 71,9 ; 72,2 ; 72,4 ; 72,6 ; 74,8 ; 74,9 (C_1 , 3C_6 , 3C_7 , 3C_9 , 3C_{11} ,

$3C_{12}$, $3C_{13}$, $3C_{14}$, $3C_{15}$, C_{21} , C_{27} , C_{28} , C_{29} , $O-CH_3$; 80,2 (C_2) ; 94,2 (C_5) ; 128,7 ; 129,1 ($2C_{24}$, $2C_{25}$) ; 134,4 ; 139,8 (C_{23} , C_{26}) ; 141,6 ; 149,7 ; 150,7 ; 154,8 ; 161,7 (C_2 , C_4 , C_6 , C_8) ; 169,8 ; 172,7 ; 173,4 ; 173,5 ; 174,4 ($2 \times C=O$ plateforme peptidique, C_4 , C_{16} , C_{22}).

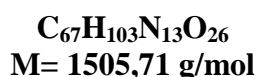
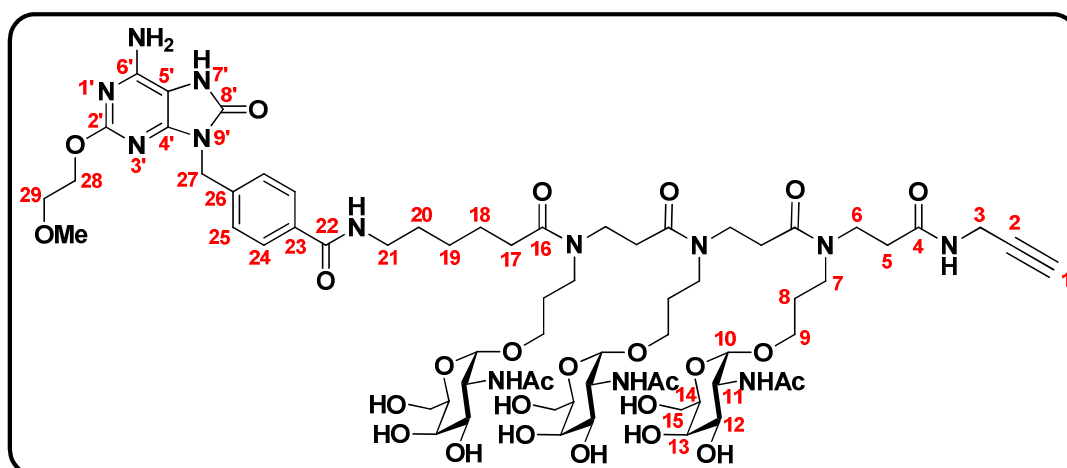
HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour $[M+2H]^{2+}/2 = 692,3243$; trouvé 692,3209 (4,9 ppm).

$[\alpha]$ = +49 (T = 25°C ; c = 0,15 ; MeOH).

HPLC: Tr = 10,7 min avec un gradient d'éluant:

- Eluant A: H₂O avec 0,1% TEA/H₃PO₄ (1:1).
- Eluant B: CH₃CN.
- L'éluant B augmente de 10% à 60% pendant 30 min (débit: 0,80 mL/min).

Edifice agoniste TLR7-espaceur-β-tripeptide *O*-GalNac(OH) **4.19**



Une solution contenant l'édifice *O*-GalNac **4.17** (0,0081 mmol, 15,2 mg) dilué dans 2,30 mL de MeOH anhydre, est traitée par 0,22 mL d'une solution de MeONa (30 mg dans 25 mL, pH = 8) pendant 1h sous argon. Le milieu est ensuite neutralisé par de la résine Dowex 50W-X8 (H⁺). La résine est filtrée, lavée par du MeOH et le filtrat est concentré sous vide pour donner le composé **4.19** sous forme de solide blanc (0,0081 mmol, 12,1 mg) de manière quantitative.

CCM: $R_f = 0,46$ (Propanol/H₂O 70:30).

IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3342-3264 (ν N-H, O-H) ; 2950 ; 2925 ; 2853 (ν C_{sp3}-H) ; 2364 (ν C≡CH) ; 1718 ; 1710 ; 1648 ; 1637 ; 1618 (ν C=O urée aromatique, amides) ; 1560 ; 1545 ; 1460 ; 1450

(v C=C et C=N, δ N-H) ; 1439 ; 1419 ; 1377 ; 1342 (δ C-H alkyles) ; 1154 ; 1121 ; 1039 (v C-O, v C-N) ; 787 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 1,58-1,71 (6H, m, 2H_{18} , 2H_{19} , 2H_{20}) ; 1,78-1,93 (6H, m, 6H_8) ; 1,99-2,05 (9H, m, $3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 2,39-2,85 (9H, m, H_1 , 6H_5 , 2H_{17}) ; 3,36-3,95 (42H , 2H_3 , 6H_6 , 6H_7 , 6H_9 , 3H_{12} , 3H_{13} , 3H_{14} , 6H_{15} , 2H_{21} , 2H_{28} ou 2H_{29} , OCH_3) ; 4,28 (3H, m, 3H_{11}) ; 4,40 (2H, m, 2H_{28} ou 2H_{29}) ; 4,76-4,84 (3H, m, 3H_{10}) ; 5,04 (2H, s, 2H_{27}) ; 7,47 (2H, d, $J_{\text{H}25-\text{H}24} = 8,2$ Hz, 2H_{25}) ; 7,78 (2H, d, $J_{\text{H}24-\text{H}25} = 8,2$ Hz, 2H_{24}).

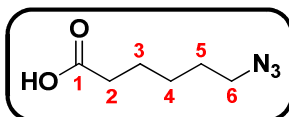
RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 22,8 ($3\times\text{CH}_3$ acétamides) ; 26,3 ; 26,4 ; 27,7 ; 27,8 ; 28,5 ; 28,7 ; 29,5 ; 29,6 ; 30,1 ; 30,2 ; 30,3 ; 30,5 ; 30,6 ; 30,8 (C_3 , 3C_8 , C_{18} , C_{19} , C_{20}) ; 33,1 ; 33,8 ; 35,2 ; 35,3 ; 36,0 (3C_5 , C_{17}) ; 40,8 ; 40,9 ; 43,9 ; 44,0 ; 44,2 ; 45,3 ; 47,3 ; 47,4 ; 51,6 ; 59,1 ; 62,9 ; 65,8 ; 65,9 ; 66,0 ; 66,1 ; 66,3 ; 66,4 ; 66,5 ; 67,3 ; 69,6 ; 69,7 ; 69,8 ; 69,9 ; 70,4 ; 71,9 ; 72,7 ; 72,8 (C_1 , 3C_6 , 3C_7 , 3C_9 , 3C_{11} , 3C_{12} , 3C_{13} , 3C_{14} , 3C_{15} , C_{21} , C_{27} , C_{28} , C_{29} , $\text{O}-\text{CH}_3$) ; 80,2 (C_2) ; 94,0 (C_5) ; 128,6 ; 129,0 (2C_{24} , 2C_{25}) ; 134,2 ; 139,2 (C_{23} , C_{26}) ; 141,6 ; 149,9 ; 150,7 ; 161,9 ($\text{C}_{2'}$, C_4' , C_6' , C_8') ; 169,7 ; 172,6 ; 173,5 ; 173,9 ; 174,1 ($3\times\text{C}=\text{O}$ acétamides, $2\times\text{C}=\text{O}$ plateforme peptoïde, C_4 , C_{16} , C_{22}).

HRMS (TOF MS ES $^+$): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 753,8642$; trouvé 753,8641 (0,1 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}/2 = 764,8551$; trouvé 764,8527 (3,1 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}/2 = 772,8421$; trouvé 772,8442 (2,7 ppm).

HPLC: Tr= 11,0 min avec un gradient d'éluant:

- Eluant A: H_2O avec 0,1% TEA/ H_3PO_4 (1:1).
- Eluant B: CH_3CN .
- L'éluant B augmente de 10% à 60% pendant 30 min (débit: 0,80 mL/min).

Acide 6-azidohexanoïque



$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$
M= 157,09 g/mol

Une solution contenant l'acide 6-bromohexanoïque (1 éq, 15,0 mmol, 3,00 g) et le NaN_3 (2éq, 30,0 mmol, 2,00 g) dilués dans 10 mL de DMF, est chauffée à 85°C pendant 3h. Du DCM

(90 mL) est ensuite ajouté. La phase organique est lavée avec une solution de HCl 0,1 N, séchée, filtrée puis concentrée pour donner l'acide 6-azidohexanoïque sous forme d'une huile incolore (14 mmol, 2,20 g), avec un rendement de 97%.

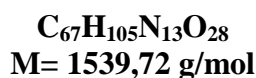
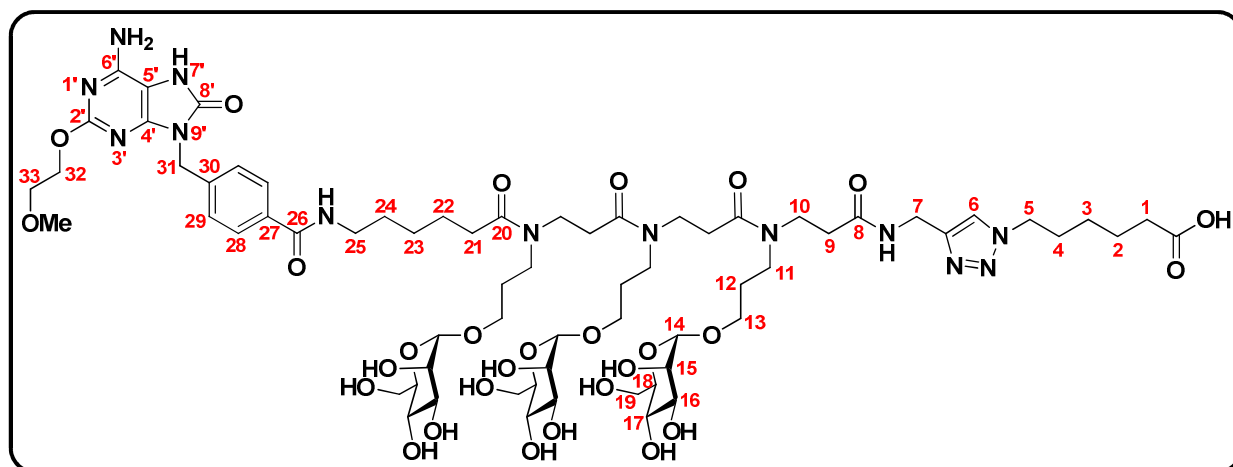
IR (ATR) ν (cm^{-1}): 3205-3070 (ν O-H) ; 3058 (ν C_{sp^2} -H) ; 2943 ; 2940 ; 2853 (ν C_{sp^3} -H) ; 2094 (ν N_3) ; 1707 (ν C=O) ; 1458 ; 1437 ; 1413 (δ C-H alkyles) ; 1281 ; 1256 ; 1227 ; 1154 ; 1098 (ν C-O et ν C-N).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,39-1,46 (2H, m, 2H_4) ; 1,58-1,70 (4H, m, 2H_3 , 2H_5) ; 2,37 (2H, t, $J_{\text{H}_2-\text{H}_3} = 7,4$ Hz, 2H_2) ; 3,27 (2H, t, $J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 6,8$ Hz, 2H_6) ; 11,15 (1H, se, CO_2H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 24,4 (C_3 ou C_5) ; 26,4 (C_4) ; 28,7 (C_3 ou C_5) ; 34,1 (C_2) ; 51,4 (C_6) ; 180,1 (C_1).

*Les données spectroscopiques sont en accord avec celles reportées dans la littérature.*²⁶³

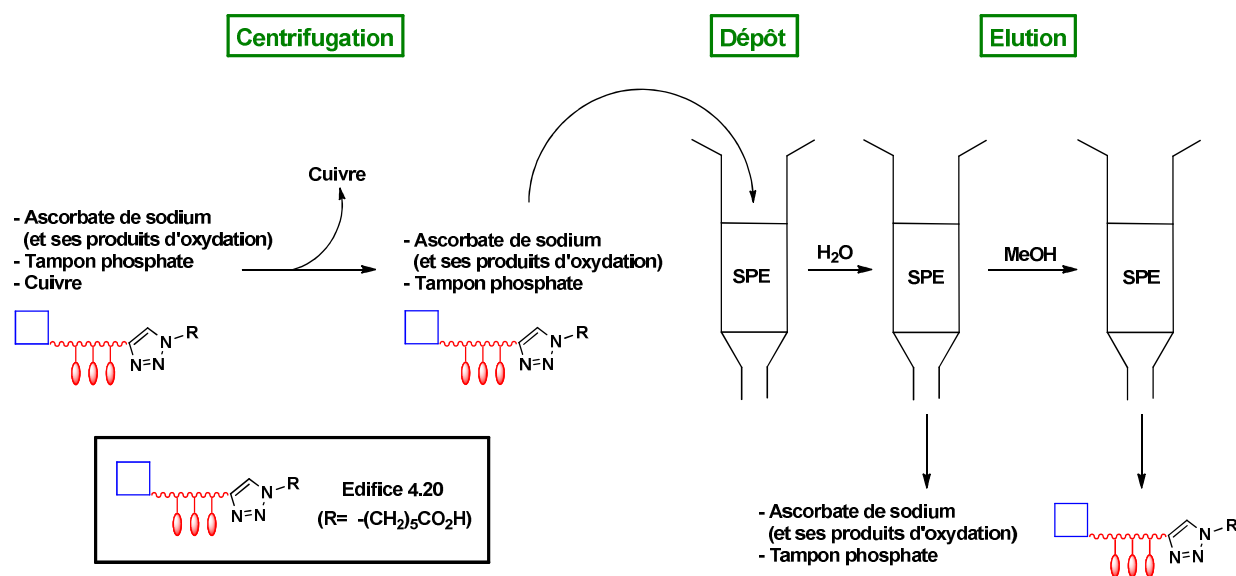
Edifice agoniste TLR7-espaceur- β -tripeptide *O*-Man(OH) 4.20



Pour cette réaction de CuAAC, l'ensemble des solvants sont dégazés et placés sous argon. Une solution de Cu^{I} est, tout d'abord, réalisée en mélangeant 500 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 0,5 M avec 500 μL d'ascorbate de sodium à 1 M à 0°C. On laisse agiter pendant 10 min. Ensuite, 100 μL de cette solution marron noir sont prélevés et injectés dans une autre solution contenant l'édifice *O*-mannosylé **4.18** (1 éq, 0,0077 mmol, 10,7 mg) et l'acide 6-azidohexanoïque (1,2 éq, 0,0093 mmol, 1,40 mg) dissouts dans 2,50 mL de tampon phosphate (pH= 8), de concentration

égale à 150 mM. Ce mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 1h. Après dilution du milieu réactionnel dans 3,00 mL d'H₂O, celui-ci est centrifugé pendant 10 min (4000 tours/min) afin d'éliminer les restes de cuivre. La solution aqueuse récupérée est purifiée sur une cartouche SPE de silice greffée C18 (Schéma ci-dessous). Les conditions utilisées pour cette dernière opération sont:

- 1) Lavage de la cartouche SPE avec 1 volume de MeOH et 4 volumes d'H₂O (conditionnement de la cartouche).
- 2) Dépôt de la solution aqueuse contenant le composé **4.20** attendu.
- 3) Lavage avec 2 volumes d'H₂O afin d'éluer les restes de tampon phosphate et d'ascorbate de sodium (ainsi que ses formes oxydées). Le composé **4.20** reste, lui, accroché à la phase stationnaire.
- 4) Elution du composé **4.20** avec plusieurs volumes de MeOH.



Le composé **4.20** attendu est finalement obtenu sous forme d'une huile incolore (0,0054 mmol, 8,3 mg) avec un rendement de 70%.

CCM: $R_f = 0,35$ (Propanol/H₂O 70:30).

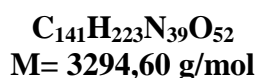
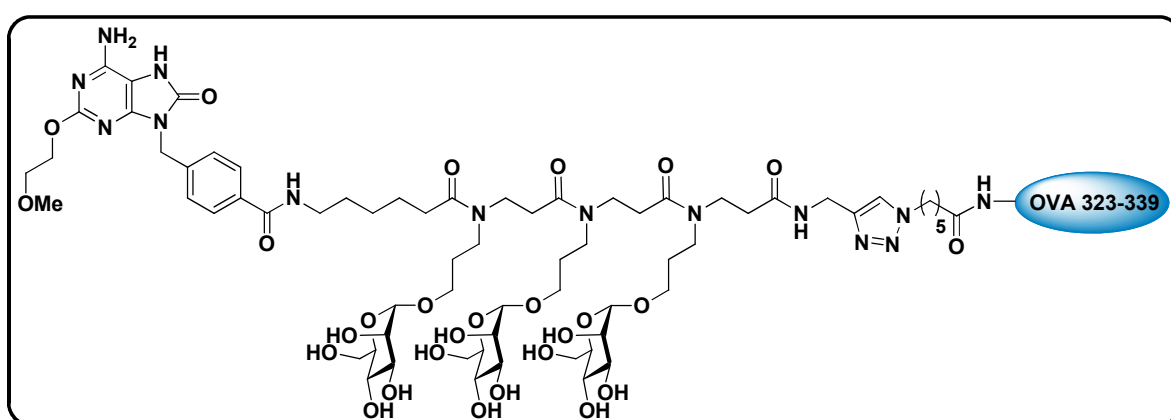
IR (ATR) ν (cm⁻¹): 3481-3090 (ν N-H, O-H) ; 2920 ; 2853 (ν C_{sp3}-H) ; 2097 ; 1710 ; 1615 (ν C=O urée aromatique, amides) ; 1586 ; 1459 (ν C=C et C=N aromatiques, δ N-H) ; 1419 ; 1344 ; 1341 (δ C-H alkyles) ; 1251 ; 1201 ; 1186 ; 1132 ; 1087 ; 1041 (ν C-O, ν C-N) ; 977 (δ C-H aromatiques).

RMN ^1H (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 1,36-1,97 (18H, m, 2H_2 , 2H_3 , 2H_4 , 6H_{12} , 2H_{22} , 2H_{23} , 2H_{24}) ; 2,30-2,75 (10H, m, 2H_1 , 6H_9 , 2H_{21}) ; 3,27-3,95 (47H, 2H_5 , 2H_7 , 2H_{10} , 2H_{11} , 2H_{13} , 3H_{15} , 3H_{16} , 3H_{17} , 3H_{18} , 6H_{19} , 2H_{25} , 2H_{32} ou 2H_{33} , $\text{O}-\text{CH}_3$) ; 4,20-4,47 (5H, m, 3H_{14} , 2H_{32} ou 2H_{33}) ; 5,03 (2H, m, 2H_{31}) ; 7,45 (2H, m, 2H_{29}) ; 7,71 (2H, m, 2H_{28}) ; 7,94 (1H, m, H_6).

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}/2 = 770,8669$; trouvé 770,8638 (3,1 ppm) ; m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}/2 = 781,8579$; trouvé 781,8499 (10,2 ppm).

HPLC: 5,9 min (MeOH/ H_2O (avec 0,1% TFA) 90:10).

Edifice complexe *O*-Man(OH) 4.21



Pour cette réaction de CuAAC, l'ensemble des solvants sont préalablement désaérogiés à travers plusieurs cycles vide (à 15 mbar)/argon puis placés sous argon. Deux solutions sont préparées en parallèle. Dans un premier temps, l'édifice *O*-mannosylé **4.18** (1 éq, 0,0026 mmol, 3,6 mg) et le peptide OVA 323-339 (1éq, 0,0026 mmol, 5 mg) sont dilués dans trois solvants différents suivant une chronologie précise: 150 μL de HFIP sont tout d'abord ajoutés, puis 50 μL d' H_2O ultrapure et enfin 100 μL de tampon HEPES (100 mM, pH= 7,5). La présence du solvant HFIP acidifiant le milieu, le pH est alors réajusté à 7,5 à l'aide d'une solution de NaOH à 0,5 N. Par la suite, une solution catalytique est réalisée également suivant une chronologie particulière: 50 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 éq, 0,0052 mmol, 1,3 mg), 50 μL de THPTA (6 éq, 0,016 mmol, 6,8 mg) et 50 μL de chlorhydrate d'aminoguanidine (5 éq, 0,013 mmol, 1,45 mg) sont tout d'abord mélangés ensemble (formation d'une solution bleue foncé), auxquels sont ajoutés, après quelques minutes d'agitation, 50 μL d'ascorbate de sodium (4 éq, 0,01 mmol, 2,1 mg). La solution devient jaune clair. Cette solution catalytique est totalement introduite dans le premier mélange. A ce

stade, le milieu réactionnel présente une concentration égale à 5 mM. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1h, à température ambiante. Après 1h de réaction, de la solution catalytique est une nouvelle fois ajoutée au milieu, contenant les mêmes quantités en THPTA (6 éq) et en chlorhydrate d'aminoguanidine (5 éq) mais avec des quantités doublées en $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 éq) et en ascorbate de sodium (8 éq). L'intérêt étant d'accélérer l'avancement. Une heure après cette injection, pour finaliser la cycloaddition, un mélange aqueux constitué uniquement de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 éq) et d'ascorbate de sodium (8 éq) est introduit. Au bout 1h d'évolution et après l'ajout d'une solution aqueuse contenant 0,5% de TFA, le milieu réactionnel est directement purifié sur une cartouche SPE de silice greffée C18. Les conditions de purification sont les suivantes:

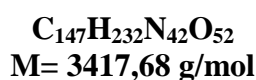
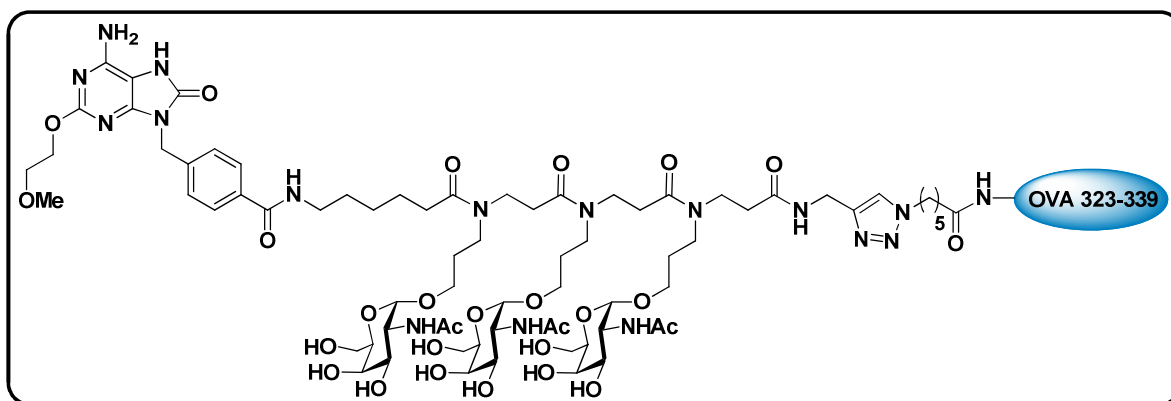
- 1) Conditionnement de la cartouche avec 2 volumes de CH_3CN et 2 volumes d' H_2O , puis introduction du milieu réactionnel.
- 2) Lavage avec 3 volumes d' H_2O pour éliminer le cuivre, l'ascorbate de sodium (et ses sous produits d'oxydation), le THPTA et le chlorhydrate d'aminoguanidine.
- 3) L'élution est effectuée avec un gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$: 85:15 (1+1/2 volumes), 75:25 (1 volume), 50:50 (1 volume), 25:75 (1 volume) et 0:100 (2 volumes).

L'édifice complexe **4.21** est élué avec l'éluant $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 75:25. Après lyophilisation, il est obtenu sous forme d'un solide blanc (0,002 mmol, 6,6 mg) avec un rendement de 77%.

HRMS (TOF MS ES+): m/z calculé pour $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}/4 = 824,6574$; trouvé 824,8961 ; m/z calculé pour $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}/3 = 1099,2074$; trouvé 1099,5420.

MALDI-TOF: m/z calculé pour $[\text{M}+\text{H}]^+ = 3295,6077$; trouvé 3295,6024 (1,6 ppm).

HPLC: Tr= 7,2 min (H_2O (avec 0,1% de TFA)/ CH_3CN 70:30).

Edifice candidat vaccin *O*-GalNAc(OH) 4.22

Pour cette réaction de CuAAC, l'ensemble des solvants sont préalablement désaérés à travers plusieurs cycles vide (à 15 mbar)/argon puis placés sous argon. Deux solutions sont préparées en parallèle. Dans un premier temps, l'édifice *O*-mannosylé **4.19** (1 éq, 0,0026 mmol, 3,9 mg) et le peptide OVA 323-339 (1 éq, 0,0026 mmol, 5 mg) sont dilués dans trois solvants différents suivant une chronologie précise: 150 μL de HFIP sont tout d'abord ajoutés, puis 50 μL d' H_2O ultrapure et enfin 100 μL de tampon HEPES (100 mM, pH = 7,5). La présence du solvant HFIP acidifiant le milieu, le pH est alors réajusté à 7,5 à l'aide d'une solution de NaOH à 0,5 N. Par la suite, une solution catalytique est réalisée également suivant une chronologie particulière: 100 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 éq, 0,01 mmol, 2,6 mg), 50 μL de THPTA (6 éq, 0,016 mmol, 6,8 mg) et 100 μL de chlorhydrate d'aminoguanidine (10 éq, 0,026 mmol, 2,9 mg) sont tout d'abord mélangés ensemble (formation d'une solution bleue foncée), auxquels sont ajoutés, après quelques minutes d'agitation, 100 μL d'ascorbate de sodium (8 éq, 0,02 mmol, 4,2 mg). La solution devient jaune clair. Cette solution catalytique est totalement introduite dans le premier mélange. Au final, le milieu réactionnel présente une concentration égale à 4 mM. Celui-ci est laissé sous agitation pendant 1h15, à température ambiante. Après l'ajout d'une solution aqueuse contenant 0,5% de TFA, le milieu réactionnel est directement purifié sur une cartouche SPE de silice greffée C18. Les conditions de purification sont les suivantes:

- 1) Conditionnement de la cartouche avec 2 volumes de CH_3CN et 2 volumes d' H_2O , puis introduction du milieu réactionnel.
- 2) Lavage avec 2 volumes d' H_2O pour éliminer le cuivre, l'ascorbate de sodium (et ses sous produits d'oxydation), le THPTA et le chlorhydrate d'aminoguanidine.

- 3) L'élution est effectuée avec un gradient H₂O/CH₃CN: 95:5 (1 volume), 90:10 (1 volume), 85:15 (1+1/2 volumes), 80:20 (1 volume), 75:25 (2 volumes), 65:35 (1 volume), 50:50 (1 volume) et 0:100 (2 volumes).

L'édifice complexe candidat vaccin **4.22** est élué avec l'éluant H₂O/CH₃CN 75:25. Après lyophilisation, il est obtenu sous forme d'un solide blanc (0,002 mol, 7,1 mg) avec un rendement de 80%.

HRMS (TOF MS ES⁺): m/z calculé pour [M+4H]⁴⁺/4 = 855,4273 ; trouvé 855,6634 ; m/z calculé pour [M+3H]³⁺/3 = 1140,2340 ; trouvé 1140,5516.

MALDI-TOF: m/z calculé pour [M+H]⁺ = 3418,6874 ; trouvé 3418,6375.

HPLC: Tr= 7,1 min (H₂O (avec 0,1% de TFA)/CH₃CN 70:30).

II. Tests immunologiques

A. Dosage des anticorps sériques par la technique ELISA

L'ELISA (pour *enzyme linked immunosorbent assay*) est une technique permettant de détecter et de doser dans un sérum ou un autre liquide biologique, un anticorps en le capturant à l'aide de l'antigène l'ayant induit. Les anticorps spécifiques d'un antigène sont mesurés dans le sérum. L'antigène est immobilisé directement sur une microplaque plastique (MAXISORP NUNC référence 439454) ou sur une microplaque pré-coatée par de la streptavidine (PIERCE référence 15507) dans le cas d'un antigène biotinylé, par une incubation d'une heure à 37°C. Un lavage élimine l'antigène non fixé puis les sérums sont déposés sur 12 puits en dilutions décroissantes de 2 en 2. La première dilution étant au 1/100. L'incubation d'une heure à 37°C est suivie d'un lavage puis d'un dépôt d'un second anticorps au 1/1000 dirigé contre les immunoglobulines de souris et qui se fixe alors à la partie Fc des anticorps. Cet anticorps (SIGMA #A3673) est lui même couplé à la peroxydase de raifort (HRP).

La dernière étape consiste à mettre en présence la HRP et son substrat H₂O₂ associé à un chromogène le TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) oxydable en une forme colorée et insoluble (1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution Thermo #34029). La présence d'anticorps anti-Tn dans nos sérums sera révélée par l'intensité de la densité optique (DO), mesurée à 450 nm.

Les antigènes immobilisés sont Tn3G7KG-biot, un peptide glycosylé couplé à la biotine, ou les composés R7GalNac3 et OVA 323-339.

Chaque titre de sérum est calculé à partir de 3 points de DO alignés, hors plateau compris entre 1,2 et 0,5 et avec les facteurs de dilution (F) correspondants. L'équation de la droite de régression correspondante : $DO = a(F) + b$, permet d'obtenir le titre exprimé en \log_{10} du facteur de dilution F favorisant l'obtention du double de la DO d'un sérum non immun dilué au 1/100.

B. Caractérisation de l'antigénicité Tn par la technique ELISA

Une variante de cette technique consiste à capturer les composés à tester et à les mettre en présence d'un anticorps monoclonal anti-Tn, 9A7 produit au laboratoire.²⁷⁸ Nous déposons dans les puits d'une microplaque (NUNC #269787) les différents composés à des concentrations variables afin de les immobiliser par interaction électrostatique. Cette technique est appelée capture de l'antigène.

Après incubation d'une nuit à 4°C et élimination de l'antigène en excédent non fixé, l'anticorps monoclonal 9A7 est ajouté pendant une heure à 37°C, suivi d'un lavage. Un second anticorps (SIGMA #A3673) dirigé contre les immunoglobulines de souris (espèce dans laquelle 9A7 a été produit) et qui se fixe alors à la partie Fc de 9A7 est ajouté. Cet anticorps est lui même couplé à la peroxydase de raifort (HRP), et révélé comme indiqué ci-dessus. La reconnaissance par l'anticorps des différents composés est proportionnelle à la densité optique mesurée.

C. Dosage des cytokines par la technique ELISA

Une variante de l'ELISA, appelée sandwich, permet de doser dans un surnageant de culture une cytokine produite. Par principe, l'antigène doit posséder deux épitopes différents. Il est alors pris en "sandwich" entre deux anticorps spécifiques de chacun des épitopes. Un premier anticorps est utilisé pour l'étape de capture pendant une nuit à 4°C. Les surnageants de culture sont ensuite déposés et la cytokine d'intérêt va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture au cours d'une incubation identique à la précédente. Le second anticorps (dit de détection), lui même couplé à de la biotine est ajouté aux plaques incubées. Au cours de l'étape suivante, on ajoute de la streptavidine HRP (BD #554066) au 1/1000. Selon le type de cytokine, les

concentrations d'anticorps varient et sont listées dans le tableau ci dessous. La forte affinité entre la biotine et la streptavidine rend le couple très stable. La dernière étape consiste à mettre la HRP en présence de son substrat. La mesure des densités optiques est alors effectuée.

La quantité d'anticorps de détection liée est proportionnelle à la quantité en cytokine immobilisée par l'anticorps de capture. L'utilisation d'une gamme étalon permet de quantifier la cytokine d'intérêt contenue dans le surnageant.

Cytokines	capture	références	détections	références
IL-6	0,5µg/mL	BD 554000	0,5µg/mL	BD 445502
IL12p40	6µg/mL	BD 551219	1µg/mL	BD 554476
IFN-gamma	0,25µg/mL	e-biosc 16-7313-85	3µg/mL	e-biosc 13-7312-85
IFN-alpha	1µg/mL		0,5nu/mL	

D. Immunisation des souris

Des souris C57BL/6 (Charles River France) sont utilisées pour les immunisations. Les composés R7GalNac3, R7GalNac3OVA2, R7Man3OVA2, R7linker ou OVA 323-339 sont injectés par voie intradermique aux jours 1 et 21 à raison de 11,7 nmol par souris. Une saignée est pratiquée aux jours 20 et 28. Les animaux sont anesthésiés à l'aide de la xylasine et de la kétamine, dans le respect des règles éthiques en vigueur. Chaque groupe de souris comprend 3 individus. Le sang est recueilli dans un tube sec et après conservation pendant 30 min à 37°C, il est placé pendant 2h au froid, les caillots formés sont éliminés et les sérums prélevés. Les sérums sont dilués au 1/100 puis de 2 en 2 sur 12 puits de microplaques.

Un ELISA type sandwich nous permet de détecter l'IL-6 et l'IL-12p40 pour évaluer la réponse inflammatoire.

E. Génération de cellules dendritiques (BMDC) à partir de cellules de moelle osseuse

Les fémurs d'une souris C57BL/6 de 6 semaines sont prélevés et les cellules de la moelle osseuse sont récupérées par perfusion du canal médullaire. Les cellules sont mises en culture à $0,25 \times 10^6$ /ml dans un milieu RPMI (Gibco #61870-036) contenant des antibiotiques (pénicilline à 100UI/mL et streptomycine à 100µg/mL Gibco #15140122), le 2-mercaptoéthanol à 5×10^{-5} M (Gibco #31350010), 10% de sérum de veau fœtal (Thermo Hyclone #30160 batch #RWH35893) et supplémenté par du GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - 2% d'un surnageant de culture de J558 préparé au laboratoire).

Après 6 jours de culture en étuve humide à 37°C, les BMDCs qui représentent la majorité des cellules en culture sont récupérées, lavées puis stimulées par les composés R7GalNac3, R7GalNac3OVA2, R7Man3OVA2, GalNac3 ou R848. Après 48h d'incubation les surnageants sont prélevés et l'IL-6 et l'IL-12p40 sont dosées par ELISA.

F. Présentation du peptide OVA 323-339 par les BMDC à des lymphocytes T CD4⁺ OT2 in vitro

➤ Mesure de la prolifération des lymphocytes T au FACS par dilution de CFSE

Les BMDCs de souris C57BL/6 sont préparées comme ci-dessus. Les lymphocytes T sont préparés par dissociation des ganglions périphériques de souris OT2 (Animalerie Centrale, Institut Pasteur), transgéniques pour le récepteur T spécifique du peptide OVA 323-339, exprimé à la surface des lymphocytes T CD4⁺.

La co-culture des BMDCs, des lymphocytes T OT2 et des différents composés permettant la présentation du peptide OVA 323-339 par les molécules de classe II du CMH, entraîne la prolifération des lymphocytes T.

Afin de mesurer la prolifération des cellules T, nous effectuons un marquage intracellulaire des lymphocytes T avant la culture, à l'aide du CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* e-bioscience 65-0850-84), composé fluorescent émettant dans le canal FITC, qui n'est pas toxique pour les cellules et dont la fluorescence est forte et stable dans le temps. Au cours de

chaque division cellulaire l'intensité de fluorescence diminue de moitié, ce qui permet de mesurer au FACS le nombre de divisions cellulaires et le nombre de cellules en division, caractéristiques de la prolifération cellulaire.

Pour ce faire, nous préparons une suspension cellulaire à 20×10^6 cellules par ml et nous ajoutons à volume égal une dilution de CFSE à 10 $\mu\text{g/mL}$. Après une incubation de 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées dans un grand volume de milieu de culture. Après numération, 2×10^4 BMDCs sont incubées avec 10^5 lymphocytes T marqués au CFSE par puits de microplaque de culture (TPP référence 92095) en milieu de culture RPMI contenant des antibiotiques (pénicilline et streptomycine), le 2-mercaptoéthanol (5×10^{-5} M) et 10% de sérum de veau fœtal. Les composés sont ajoutés à dose décroissante de 10 à 10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ à raison de 3 puits par point. Après 72h de culture, la prolifération des lymphocytes T OT2 est mesurée au cytomètre de flux. Les lymphocytes T OT2 sont identifiés par la présence à leur surface du marqueur CD4. La décroissance de la fluorescence émise par le CFSE dans la population des cellules CD4 est suivie. La fluorescence des cellules sans composé ajouté constitue la fluorescence de référence. Elle diffère de celle des cellules activées, pour lesquelles le CFSE est dilué. Cette fluorescence des cellules activées décroît progressivement et présente plusieurs pics correspondant en autant de divisions.

G. Mesure de l'activation des LT CD4⁺ OT2 in vivo

➤ Mesure de la prolifération par quantification des lymphocytes T (cytométrie FACS)

Les lymphocytes T sont préparés par dissociation des ganglions périphériques de souris OT2 puis centrifugés et remis en suspension dans un tampon PBS (tampon phosphate à pH7 Gibco #14190-090). Ces lymphocytes T OT2 sont injectés à raison de 2×10^5 cellules par voie intraveineuse à des souris C57BL/6. Le lendemain, les animaux sont immunisés par voie intradermique avec les différents composés fournis (11,7 nmol par animal). Cinq jours plus tard, les animaux sont sacrifiés et la rate ainsi que les ganglions drainants le point d'injection, sont prélevés et dilacérés individuellement en milieu RPMI. Ensuite, les cellules sont filtrées et centrifugées.

Pour identifier les lymphocytes T CD4⁺ OT2, nous marquons les cellules avec les anticorps suivants anti-CD4 (e-bioscience 25-0042-82), anti-Valpha2 (e-bioscience 47-5812-82) et anti-Vbeta5 (e-bioscience 46-5796-82). Pour identifier les cellules produisant l'IFN- γ nous effectuons

un marquage intracellulaire à l'aide d'un anticorps anti-IFN- γ (e-bioscience #17-7311-82). Les cellules mortes sont exclues de l'analyse avec un marqueur nucléaire, le Blue Live Dead (Live Technologies #L-23105). Le tampon utilisé pour les marquages est du PBS contenant 2% de sérum de veau fœtal et 2,5 mM d'EDTA.

Les cellules de ganglions et 5×10^6 splénocytes sont réparties dans les puits d'une microplaque (Thermo #442587). Après centrifugation, les cellules sont mises à sec et remises en suspension dans les mix d'anticorps puis incubées dans le noir et à froid pendant 15 min. Cette première étape est un marquage de surface suivie, après élimination et lavage, du marquage intracellulaire comprenant lui-même 2 étapes à savoir fixation et perméabilisation (Cytofix/Cytoperm BD 554722) des cellules durant 25 min à 4°C. Le marquage intracellulaire proprement dit par l'anticorps anti-IFN- γ au 1/100 est effectué dans le tampon de perméabilisation (PermWash BD 554723). Après élimination des anticorps non fixés par lavage, les cellules sont reprises dans 200 μ L de tampon FACS.

On ajoute 10 μ L d'une suspension de billes couplées à un fluorochrome PE de concentration connue pour le comptage des cellules présentes dans la suspension.

Les lymphocytes T OT2 sont identifiés parmi la population CD4 par la présence à leur surface des deux marqueurs Valpha2 et Vbeta5. Le nombre de billes comptées nous permet de calculer le nombre total de OT2 dans l'échantillon à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{\text{Nbre OT2 acquises} \times \text{Nbre de billes dans l' échantillon}}{\text{Nbre de billes acquises}}$$

$$\text{Nbre de billes acquises}$$

➤ Mesure de l'IFN- γ produit par les lymphocytes T CD4⁺ activés in vivo

Les cellules de rate sont mises en culture à raison de 5×10^5 cellules par puits en milieu complet en présence ou en absence du peptide OVA 323-339, à la concentration de 10 et 1 μ g/mL. Le milieu complet est un milieu RPMI contenant des antibiotiques (pénicilline et streptomycine), du β -2-mercaptoéthanol (à 5×10^{-5} M) et 10% de sérum de veau fœtal. Après une culture en étuve humide à 37°C pendant 48h, les surnageants sont prélevés et l'IFN- γ produit par les lymphocytes T est mesuré par ELISA.

Références Bibliographiques

- ¹ Kindt, T. J.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby* **2008**, Edition Dunod, 684 p.
- ² Guillot, J.; Guerry, M.; Konska, G.; Caldefie-Chezet, F.; de Latour, M.; Penault-Llorca, F. Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation: cas des carcinomes mammaires. *Bulletin du Cancer* **2004**, *91*, 141-158.
- ³ Dwek, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 683-720.
- ⁴ Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- ⁵ Davis, B. C. Synthesis of Glycoproteins. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 579-601.
- ⁶ Aksoy, N.; Faruk Akinci, O. Mucin Macromolecules in Normal, Adenomatous, and Carcinomatous Colon: Evidence for the Neotransformation. *Macromolecular Bioscience* **2004**, *4*, 483-496.
- ⁷ Brooks, S. A.; Carter, T. M.; Royle, L.; Harvey, D. J.; Fry, S. A.; Kinch, C.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. Altered Glycosylation of Proteins in Cancer: What Is the Potential for New Anti-Tumour Strategies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 2-21.
- ⁸ Agrawal, B.; Gendler, S. J.; Longenecker, B. M. The biological role of mucin in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Molecular Medicine today* **1998**, *4*, 397-403.
- ⁹ Agrawal, B.; Krantz, M. J.; Parker, J.; Longenecker, B. M. Expression of MUC1 Mucin on Activated Human T Cells: Implications for a Role of MUC1 in Normal Immune Regulation. *Cancer research* **1998**, *58*, 4079-4081.
- ¹⁰ Wykes, M.; MacDonald, K. P. A.; Tran, M.; Quin, R. J.; Xing, P. X.; Gendler, S. J.; Hart, D. N. J.; McGuckin, M. A. MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* **2002**, *72*, 692-701.
- ¹¹ Ho, S. B.; Shekels, L. L.; Toribara, N. W.; Kim, Y. S.; Lyftogt, C.; Cherwitz, D. L.; Niehans, G. A. Mucin Gene Expression in Normal, Preneoplastic, and Neoplastic Human Gastric Epithelium. *Cancer Research* **1995**, *55*, 2681-2690.
- ¹² Hollingsworth, M. A.; Swanson, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer* **2004**, *4*, 45-60.
- ¹³ Hakomori, S-H. Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives. *Cancer Research* **1985**, *45*, 2405-2414.
- ¹⁴ Siroy, A.; Abdul-Karim, F. W.; Miedler, J.; Fong, N.; Fu, P.; Gilmore, H.; Baar, J. MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Human Pathology* **2013**, *44*, 2159-2166.
- ¹⁵ Carraway, K. L.; Ramsauer, V. P.; Haq, B.; Carothers Carraway, C. A. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays* **2003**, *25*, 66-71.
- ¹⁶ Singh, P. K.; Hollingsworth, M. A. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in Cell Biology* **2006**, *16*, 467-476.
- ¹⁷ Yin, L.; Li, Y.; Ren, J.; Kuwahara, H.; Kufe, D. Human MUC1 Carcinoma Antigen Regulates Intracellular Oxidant Levels and the Apoptotic Response to Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, *276*, 6061-6064.
- ¹⁸ Kitamoto, S.; Yokoyama, S.; Higashi, M.; Yamada, N.; Takao, S.; Yonezawa, S. MUC1 enhances hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors. *Oncogene* **2013**, *32*, 4614-4621.
- ¹⁹ Schroeder, J. A.; Adriance, M. C.; Thompson, M. C.; Camenisch, T. D.; Gendler, S. J. MUC1 alters b-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. *Oncogene* **2003**, *22*, 1324-1332.
- ²⁰ Gildersleeve, J. C.; Wang, B.; Achilefu, S.; Tu, Z.; Xu, M. Glycan array analysis of the antigen repertoire targeted by tumor-binding antibodies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 6839-6843.
- ²¹ Wilson, M. R.; Danishefsky, S. J. A Vision for Vaccines Built from Fully Synthetic Tumor-Associated Antigens: From the Laboratory to the Clinic. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 14462-14472.
- ²² Chang, W-W.; Lee, C. H.; Lee, P.; Lin, J.; Hsu, C-W.; Hung, J-T.; Lin, J-J.; Yu, J-C.; Shao, L-e.; Yu, J.; Wong, C-H.; Yu, A. L. Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 11667-11672.
- ²³ Zhang, S.; Zhang, H. S.; Cordon-Cardo, C.; Reuter, V. E.; Singhal, A. K.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. Selection of Tumor Antigens as Targets for Immune Attack using Immunohistochemistry: II. Blood Group-Related Antigens. *International Journal of Cancer* **1997**, *56*, 50-56.
- ²⁴ Zhang, S.; Cordon-Cardo, C.; Zhang, H. S.; Reuter, V. E.; Alduri, S.; Hamilton, W. B.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. Selection of Tumor Antigens as Targets for Immune Attack using Immunohistochemistry: I. Focus on Gangliosides. *International Journal of Cancer* **1997**, *56*, 50-56.
- ²⁵ Tongzhong, J.; Otto, V. I.; Cummings, R. D. The Tn Antigen-Structural Simplicity and Biological Complexity. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 1770-1791.
- ²⁶ Springer, G. F.; Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine* **1997**, *75*, 594-602.

- ²⁷ Wang, Y.; Tongzhong, J.; Ding, X.; Xia, B.; Wang, W.; Xia, L.; He, M.; Cummings, R. D. Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 9228-9233.
- ²⁸ Barr, N.; Taylor, C. R.; Young, T.; Springer, G. F. Are Pancarcinoma T and Tn Differenciatio Antigen?. *Cancer* **1989**, *64*, 834-841.
- ²⁹ Zhang, S.; Zhang, H. S.; Reuter, V. E.; Slovin, S. F.; Scher, H. I.; Livingston, P. O. Expression of Potential Target Antigens for Immunotherapy on Primary and Metastatic Prostate Cancers. *Clinical Cancer Research* **1998**, *4*, 295-302.
- ³⁰ Springer, G. F.; Cheingsong-Popov, R.; Schirmacher, V.; Desai, P. R.; Tegtmeier, H. Proposed Molecular Basis of Murine Tumor Cell-Hepatocyte Interaction. *The Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 5702-5706.
- ³¹ Sealand, E.; van Vliet, S. J.; Bäckström, M.; van den Berg, V. C. M.; Geijtenbeek, T. B. H.; Meijer, G. A.; van Kooyk, Y. The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunology Immunotherapy* **2007**, *56*, 1225-1236.
- ³² Reis, C. A.; Osorio, H.; Silva, L.; Gomes, C.; David, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of Clinical Pathology* **2010**, *63*, 322-329.
- ³³ Danishefsky, S. J.; Allen, J. R. From the Laboratory to the Clinic: A Retrospective on Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 836-863.
- ³⁴ Steinman, R. M.; Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *The Journal of Experimental Medicine* **1973**, *137*, 1142-1162.
- ³⁵ Zaba, L. C.; Krueger, J. G.; Lowes, M. A. Resident and "Inflammatory" Dendritic Cells in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2009**, *129*, 302-308.
- ³⁶ Mellman, I.; Steinman, R. M. Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell* **2001**, *106*, 255-258.
- ³⁷ Steinman, R. M.; Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **2007**, *449*, 419-426.
- ³⁸ Tang, C-K.; Sheng, K-C.; Apostolopoulos, V.; Pietersz, G. Protein/ peptide and DNA vaccine delivery by targeting C-type lectin receptors. *Expert Reviews of Vaccines* **2008**, *7*, 1005-1018.
- ³⁹ Jiang, W.; Swiggard, W. J.; Heufer, C.; Peng, M.; Mirza, A.; Steinman, R. M.; Nussenger, M. C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **1995**, *375*, 151-155.
- ⁴⁰ Engering, A. J.; Cella, M.; Fluitsma, D.; Brockhaus, M.; Hoefsmit, E. C. M.; Lanzavecchia, A.; Pieters, J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* **1997**, *27*, 2417-2425.
- ⁴¹ Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* **2001**, *2*, 675-680.
- ⁴² Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **2001**, *1*, 135-145.
- ⁴³ Banchereau, J.; Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **1998**, *392*, 245-252.
- ⁴⁴ Ueno, H.; Klechevsky, E.; Morita, R.; Aspor, C.; Cao, T.; Matsui, T.; Di Pucchio, T.; Connolly, J.; Fay, J. W.; Pascual, V.; Palucka, A. K.; Banchereau, J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews* **2007**, *219*, 118-142.
- ⁴⁵ Steinman, R. M. Dendritic Cells In Vivo: A Key Target for a New Vaccine Science. *Immunity* **2008**, *29*, 319-324.
- ⁴⁶ Avignan, D. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *Blood Reviews* **1999**, *13*, 51-64.
- ⁴⁷ Steinman, R. M.; Pope, M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *The Journal of Clinical Investigation* **2002**, *109*, 1519-1526.
- ⁴⁸ Goldsby, R. A.; Kindt, T. J.; Osborne, B. A. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby* **2001**, Edition Dunod, 660 p.
- ⁴⁹ Bay, S.; Freire, T. Immunothérapie anti-tumorale ciblée sur des antigènes osidiques. *Revue Francophone des Laboratoires* **2006**, *381*, 39-46.
- ⁵⁰ Scott, A. M.; Welt, S. Antibody-based immunological therapies. *Current Opinion in Immunology* **1997**, *9*, 717-722.
- ⁵¹ Bay, J-O.; Penault-Llorca, F.; Ravaud, A.; Chevreau, C.; Négrier, S.; Escudier, B. New entities in pathological classification and new therapeutic options in renal cell carcinoma. *Bulletin du Cancer* **2006**, *93*, 91-100.
- ⁵² Adams, G. P.; Weiner, L. M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 1147-1157.
- ⁵³ Allison, J. P.; Hurwitz, A. A.; Leach, D. R. Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Current Opinion in Immunology* **1995**, *7*, 682-686.
- ⁵⁴ Banchereau, J.; Palucka, A. K. Dendritic Cells as Therapeutic Vaccines Against Cancer. *Nature Reviews Immunology* **2005**, *5*, 296-306.

- ⁵⁵ Cremer, G.-A.; Bureau, N.; Lelièvre, D.; Piller, V.; Piller, F.; Delmas, A. Synthesis of Branched Oxime-Linked Peptide Mimetics of the MUC1 Containing a Universal T-Helper Epitope. *Chemistry - A European Journal* **2004**, *10*, 6353-6360.
- ⁵⁶ Buskas, T.; Thompson, P.; Boons, G.-J. Immunotherapy for cancer: synthetic carbohydrate-based vaccines. *Chemical Communications* **2009**, *36*, 5335-5349.
- ⁵⁷ Slovin, S. F.; Keding, S. J.; Ragupathi, G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunology and Cell Biology* **2005**, *83*, 418-428.
- ⁵⁸ Helling, F.; Shang, A.; Calves, M.; Zhang, S.; Ren, S.; Yu, R. K.; Oettgen, H. F.; Livingston, P. O. G_{D3} Vaccines for Melanoma: Superior Immunogenicity of Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccines. *Cancer Research* **1994**, *54*, 197-203.
- ⁵⁹ Kudryashov, V.; Kim, H. M.; Ragupathi, G.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Lloyd, K. O. Immunogenicity of synthetic conjugates of Lewis^y oligosaccharide with proteins in mice: towards the design of anticancer vaccines. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **1998**, *45*, 281-286.
- ⁶⁰ Sabbatini, P. J.; Kudryashov, V.; Ragupathi, G.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Bornmann, W.; Spassova, M.; Zatorski, A.; Spriggs, D.; Aghajanian, C.; Soignet, S.; Peyton, M.; O'Flaherty, C.; Curtin, J.; Lloyd, K. O. Immunization of ovarian cancer patients with a synthetic Lewis^y-protein conjugate vaccine: a phase I trial. *International Journal of Cancer* **2000**, *87*, 79-85.
- ⁶¹ Ragupathi, G.; Park, T. K.; Zhang, S.; Kim, I. J.; Graber, L.; Adluri, S.; Lloyd, K. O.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Immunization of Mice with a Fully Synthetic Globo-H Antigen Results in Antibodies against Human Cancer Cells: A Combined Chemical-Immunological Approach to the Fashioning of an Anticancer Vaccine. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, *36*, 125-128.
- ⁶² Slovin, S. F.; Ragupathi, G.; Adluri, S.; Ungers, G.; Terry, K.; Kim, S.; Spassova, M.; Bornmann, W.; Fazzari, M.; Dantis, L.; Olkiewicz, K.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J.; Scher, H. I. Carbohydrate vaccines in cancer: Immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 5710-5715.
- ⁶³ Gilewski, T.; Ragupathi, G.; Bhuta, S.; Williams, L. J.; Musselli, C.; Zhang, X.-F.; Bencsath, K. P.; Panageas, K. S.; Chin, J.; Hudis, C. A.; Norton, L.; Houghton, A. N.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: A phase I trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 3270-3275.
- ⁶⁴ Buskas, T.; Li, Y.; Boons, G.-J. Synthesis of a Dimeric Lewis Antigen and the Evaluation of the Epitope Specificity of Antibodies Elicited in Mice. *Chemistry - A European Journal* **2005**, *11*, 5457-5467.
- ⁶⁵ Krug, L. M.; Ragupathi, G.; Hood, C.; Kris, M. G.; Miller, V. A.; Allen, J. R.; Keding, S. J.; Danishefsky, S. J.; Gomez, J.; Tyson, L.; Pizzo, B.; Baez, V.; Livingston, P. O. Vaccination of Patients with Small-Cell Lung Cancer with Synthetic Fucosyl GM-1 Conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin. *Clinical Cancer Research* **2004**, *10*, 6094-6100.
- ⁶⁶ Musselli, C.; Livingston, P. O.; Ragupathi, G. Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **2001**, *127* (suppl 2), R20-R26.
- ⁶⁷ Miles, D. W.; Towlson, K. E.; Graham, R.; Reddish, M.; Longenecker, B. M.; Taylor-Papadimitriou, J.; Rubens, R. D. A randomised phase II study a sialyl-Tn and DETOX-B adjuvant with or without cyclophosphamide pretreatment for the active specific immunotherapy of breast cancer. *British Journal of Cancer* **1996**, *74*, 1292-1296.
- ⁶⁸ Kirkwood, J. M.; Ibrahim, J. G.; Sosman, J. A.; Sandak, V. K.; Agarwala, S. S.; Ernstoff, M. S.; Rao, R. High-Dose Interferon Alfa-2b Significantly Prolongs Relapse-Free and Overall Survival Compared With the GM2-KLH/QS-21 Vaccine in Patients With Resected Stage IIB-III Melanoma: Results of Intergroup Trial E1694/S9512/C509801. *Journal of Clinical Oncology* **2001**, *19*, 2370-2380.
- ⁶⁹ Holmberg, L. A.; Sandmaier, B. M. Vaccination with Theratope® (STn-KLH) as treatment for breast cancer. *Expert Reviews of Vaccines* **2004**, *3*, 655-663.
- ⁷⁰ Kuduk, S. D.; Schwarz, J. B.; Chen, X.-T.; Glunz, P. W.; Sames, D.; Ragupathi, G.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. Synthetic and Immunological Studies on Clustered Modes of Mucin-Related Tn and TF O-Linked Antigens: The Preparation of a Glycopeptide-Based Vaccine for Clinical Trials against Prostate Cancer. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 12474-12485.
- ⁷¹ Slovin, S. F.; Ragupathi, G.; Musselli, C.; Olkiewicz, K.; Verbel, D.; Kuduk, S. D.; Schwarz, J. B.; Sames, D.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Scher, H. I. Fully Synthetic Carbohydrate-Based Vaccines in Biochemically Relapsed Prostate Cancer: Clinical Trial Results With α -N-Acetylgalactosamine-O-Serine/Threonine Conjugate Vaccine. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, *21*, 4292-4298.
- ⁷² Slovin, S. F.; Ragupathi, G.; Musselli, C.; Fernandez, C.; Diani, M.; Verbel, D.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Scher, H. I. Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for prostate cancer vaccine: clinical trial results with

TF cluster (c)-KLH plus QS-21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2005**, *54*, 694-702.

⁷³ Sørensen, A. L.; Reis, C. A.; Tarp, M. A.; Mandel, U.; Ramachandran, K.; Sankaranarayanan, K.; Schwientek, T.; Graham, R.; Taylor-Papadimitriou, J.; Hollingsworth, M. A.; Burchell, J.; Clausen, H. Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. *Glycobiology* **2006**, *16*, 96-107.

⁷⁴ Kagan, E.; Ragupathi, G.; Yi, S. S.; Reis, C. A.; Gildersleeve, J.; Kahne, D.; Clausen, H.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2005**, *54*, 424-430.

⁷⁵ Ragupathi, G.; Koide, F.; Sathyan, N.; Kagan, E.; Spassova, M.; Bornmann, W.; Gregor, P.; Reis, C. A.; Clausen, H.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. A preclinical study comparing approaches for augmenting the immunogenicity of a heptavalent KLH-conjugate vaccine against epithelial cancers. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2003**, *52*, 608-616.

⁷⁶ Sabbatini, P. J.; Ragupathi, G.; Hood, C.; Aghajanian, C. A.; Juretzka, M.; Iasonos, A.; Hensley, M. L.; Spassova, M. K.; Ouerfelli, O.; Spriggs, D. R.; Tew, W. P.; Konner, J.; Clausen, H.; Rustum, N. A.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Pilot Study of a Heptavalent Vaccine-Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate plus QS-21 in Patients with Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, or Peritoneal Cancer. *Clinical Cancer Research* **2007**, *13*, 4170-4177.

⁷⁷ Allen, J. R.; Harris, C. R.; Danishefsky, S. J. Pursuit of Optimal Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines: Preparation of a Multiantigenic Unimolecular Glycopeptide Containing the Tn, MBr1, and Lewis^x Antigens. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 1890-1897.

⁷⁸ Ragupathi, G.; Coltart, D. M.; Williams, L. J.; Koide, F.; Kagan, E.; Allen, J.; Harris, C.; Glunz, P. W.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. On the power of chemical synthesis: Immunological evaluation of models for multiantigenic carbohydrate-based cancer vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 13699-13704.

⁷⁹ Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. Prospects for total synthesis: A vision for a totally synthetic vaccine targeting epithelial tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 11937-11942.

⁸⁰ Ragupathi, G.; Koide, F.; Livingston, P. O.; Cho, Y. S.; Endo, A.; Wan, Q.; Spassova, M. K.; Keding, S. J.; Allen, J.; Ouerfelli, O.; Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. Preparation and Evaluation of Unimolecular Pentavalent and Hexavalent Antigenic Constructs Targeting Prostate and Breast Cancer: A Synthetic Route to Anticancer Vaccine Candidates. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 2715-2725.

⁸¹ Zhu, J.; Wan, Q.; Lee, D.; Yang, G.; Spassova, M. K.; Ouerfelli, O.; Ragupathi, G.; Damani, P.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. From Synthesis to Biologics: Preclinical Data on a Chemistry Derived Anticancer Vaccine. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 9298-9303.

⁸² Buskas, T.; Li, Y.; Boons, G.-J. The Immunogenicity of the Tumor-Associated Antigen Lewis^x May Be Suppressed by a Bifunctional Cross-Linker Required for Coupling to a Carrier Protein. *Chemistry - A European Journal* **2004**, *10*, 3517-3524.

⁸³ Hoffmann-Röder, A.; Kaiser, A.; Wagner, S.; Gaidzik, N.; Kowalczyk, D.; Westerlind, U.; Gerlitzki, B.; Schmitt, E.; Kunz, H. Synthetic Antitumor Vaccines from Tetanus Toxoid Conjugates of MUC1 Glycopeptides with the Thompson-Friedenreich Antigen and a Fluorine-Substituted Analogue. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 8498-8503.

⁸⁴ Yang, F.; Zheng, X.-J.; Huo, C.-X.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Ye, X.-S.; Enhancement of the Immunogenicity of Synthetic Carbohydrate Vaccines by Chemical Modifications of STn Antigen. *ACS Chemical Biology* **2011**, *6*, 252-259.

⁸⁵ Yin, Z.; Cormellas-Aragones, M.; Chowdhuri, S.; Bentley, P.; Kaczanowska, K.; BenMohamed, L.; Gildersleeve, J. C.; Finn, M. G.; Huang, X. Boosting Immunity to Small Tumor-Associated with Bacteriophage Q β Capsids. *ACS Chemical Biology* **2013**, *8*, 1253-1262.

⁸⁶ Kawai, T.; Akira, S. TLR signaling. *Seminars in Immunology* **2007**, *19*, 24-32.

⁸⁷ Hemmi, H.; Kaisho, T.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Sanjo, H.; Hoshino, K.; Horiuchi, T.; Tomikawa, H.; Takeda, K.; Akira, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology* **2002**, *3*, 196-200.

⁸⁸ Pulendran, B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunological Reviews* **2004**, *199*, 227-250.

⁸⁹ Romagne, F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 80-87.

⁹⁰ Cooper, C. L.; Davis, H. L.; Morris, M. L.; Efler, S. M.; Al Adhami, M.; Krieg, A. M.; Cameron, D. W.; Heathcote, J. CPG 7909, an Immunostimulatory TLR9 Agonist Oligodeoxynucleotide, as Adjuvant to Engerix-B[®]

HBV Vaccine in Healthy Adults: A Double-Blind Phase I/II Study. *Journal of Clinical Immunology* **2004**, 24, 693-701.

⁹¹ Horsmans, Y.; Berg, T.; Desager, J.-P.; Mueller, T.; Schott, E.; Fletcher, S. P.; Steffy, K. R.; Bauman, L. A.; Kerr, B. M.; Averett, D. R. Isatoribine, an Agonsit of TLR7, Reduces Plasma Virus Concentration in Chronic Hepatitis C Infection. *Hepatology* **2005**, 42, 724-731.

⁹² Smits, E. L. J. M.; Ponsaerts, P.; Berneman, Z. N.; Van Tendeloo, V. F. I. The Use of TLR7 and TLR8 Ligands for the Enhancement of Cancer Immunotherapy. *The Oncologist* **2008**, 13, 859-875.

⁹³ Baldrige, J. R.; McGowan, P.; Evans, J. T.; Cluff, C.; Mossman, S.; Johnson, D.; Persing, D. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opinion in Biological Therapy* **2004**, 4, 1129-1138.

⁹⁴ Geisse, J.; Caro, I.; Lindholm, J.; Golitz, L.; Stampone, P.; Owens, M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2004**, 50, 722-733.

⁹⁵ Ray, C. M.; Kluk, M.; Grin, C. M.; Grant-Kels, J. M. Successful treatment of malignant melanoma *in situ* with topical 5% imiquimod cream. *International Journal of Dermatology* **2005**, 44, 428-434.

⁹⁶ Wille-Reece, U.; Wu, C.-y.; Flynn, B. J.; Kedl, R. M.; Seder, R. A. Immunization with HIV-1 Gag Protein Conjugated to a TLR7/8 Agonist Results in the Generation of HIV-1 Gag-Specific Th1 and CD8⁺ T Cell Responses. *The Journal of Immunology* **2005**, 174, 7676-7683.

⁹⁷ Wille-Reece, U.; Flynn, B. J.; Loré, K.; Koup, R. A.; Kedl, R. M.; Mattapallil, J. J.; Weiss, W. R.; Roederer, M.; Seder, R. A. HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8⁺ T cell responses in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 15190-15194.

⁹⁸ Toyokuni, T.; Dean, B.; Cai, S.; Boivin, D.; Hakomori, S.-I.; Singhal, A. K. Synthetic Vaccines: Synthesis of a Dimeric Tn Antigen-Lipo peptide Conjugate That Elicits Immune Responses against Tn-Expressing Glycoproteins. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 395-396.

⁹⁹ Toyokuni, T.; Hakomori, S.-I.; Singhal, A. K. Synthetic Carbohydrate Vaccines: Synthesis and Immunogenicity of Tn Antigen Conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1994**, 2, 1119-1132.

¹⁰⁰ Kudryashov, V.; Glunz, P. W.; Williams, L. J.; Hintermann, S.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Toward optimized carbohydrate-based anticancer vaccines: Epitope clustering, carrier structure, and adjuvant all influence antibody responses to Lewis^x conjugates in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 3264-3269.

¹⁰¹ Glunz, P. W.; Hintermann, S.; Schwarz, J. B.; Kuduk, S. D.; Chen, X.-T.; Williams, L. J.; Sames, D.; Danishefsky, S. J.; Kudryashov, V.; Lloyd, K. O. Probing Cell Surface "Glyco-Architecture through Total Synthesis. Immunological Consequences of a Human Blood Group Determinant in a Clustered Mucin-like Context. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, 10636-10637.

¹⁰² Geraci, C.; Consoli, G. M. L.; Galante, E.; Bousquet, E.; Pappalardo, M.; Spadaro, A. Calix[4]arene Decorated with Four Tn Antigen Glycomimetic Units and P3CS Immuno adjuvant: Synthesis, Characterization, and Anticancer Immunological Evaluation. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, 19, 751-758.

¹⁰³ Bay, S.; Fort, S.; Birikaki, L.; Ganneau, C.; Samain, E.; Coïc, Y.-M.; Bonhomme, F.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Lo-Man, R. Induction of a Melanoma-Specific Antibody Response by a Monovalent, but not a Divalent, Synthetic GM2 Neoglycopeptide. *ChemBioChem* **2009**, 4, 582-587.

¹⁰⁴ Dziadek, S.; Hobel, A.; Schmitt, E.; Kunz, H. A Fully Synthetic Vaccine Consisting of a Tumor-Associated Glycopeptide Antigen and a T-Cell Epitope for the Induction of a Highly Specific Humoral Immune Response. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, 7630-7635.

¹⁰⁵ Westerlind, U.; Hobel, A.; Gaidzik, N.; Schmitt, E.; Kunz, H. Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigens and a T-Cell Epitope for the Induction of a Highly Specific Humoral Immune Response. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, 7551-7556.

¹⁰⁶ Cremer, G.-A.; Bureau, N.; Piller, V.; Kunz, H.; Piller, F.; Delmas, A. F. Synthesis and Biological Evaluation of a Multiantigenic Tn/TF-Containing Glycopeptide Mimic of the Tumor-Related MUC1 Glycoprotein. *ChemMedChem* **2006**, 1, 965-968.

¹⁰⁷ Bay, S.; Lo-Man, R.; Osinaga, E.; Nakada, H.; Leclerc, C.; Cantacuzène, D. Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. *Journal of Peptide Research* **1997**, 49, 620-625.

¹⁰⁸ Lo-Man, R.; Bay, S.; Vichier-Guerre, S.; Dériaud, E.; Cantacuzène, D.; Leclerc, C. A Fully Synthetic Immunogen Carrying a Carcinoma-associated Carbohydrate for Active Specific Immunotherapy. *Cancer Research* **1999**, 59, 1520-1524.

¹⁰⁹ Reddish, M. A.; Jackson, L.; Koganty, R. R.; Qiu, D.; Hong, W.; Longenecker, B. M. Specificities of anti-sialyl-Tn and anti-Tn monoclonal antibodies generated using novel clustered synthetic glycopeptide epitopes. *Glycoconjugate Journal* **1997**, 14, 549-560.

- ¹¹⁰ Nakada, H.; Inoue, M.; Numata, Y.; Tanaka, M.; Funakoshi, I.; Fukui, S.; Mellors, A.; Yamashina, I. Epitopic structure of Tn glycoporphin A for an anti-Tn antibody (MLS 128). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 2495-2499.
- ¹¹¹ Nakada, H.; Numata, Y.; Inoue, M.; Tanaka, M.; Kitagawa, H.; Funakoshi, I.; Fukui, S.; Yamashina, I. Elucidation of an Essential Structure Recognized by an Anti-GalNAc α -Ser(Thr) Monoclonal Antibody (MLS 128)*. *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 12402-12405.
- ¹¹² Lo-Man, R.; Vichier-Guerre, S.; Bay, S.; Dériaud, E.; Cantacuzène, D.; Leclerc, C. Anti-Tumor Immunity Provided by a Synthetic Multiple Antigenic Glycopeptide Displaying a Tri-Tn Glycotope. *The Journal of Immunology* **2001**, *166*, 2849-2854.
- ¹¹³ Lo-Man, R.; Vichier-Guerre, S.; Perraut, R.; Dériaud, E.; Huteau, V.; BenMohamed, L.; Diop, O. M.; Livingston, P. O.; Bay, S.; Leclerc, C. A Fully Synthetic Therapeutic Vaccine Candidate Targeting Carcinoma-Associated Tn Carbohydrate Antigen Induces Tumor-Specific Antibodies in Nonhuman Primates. *Cancer Research* **2004**, *64*, 4987-4994.
- ¹¹⁴ Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1149-1159.
- ¹¹⁵ Sarkar, S.; Lombardo, S. A.; Herner, D. N.; Talan, R. S.; Wall, K. A.; Sucheck, S. J. Synthesis of a Single-Molecule L-Rhamnose-Containing Three-Component Vaccine and Evaluation of Antigenicity in the Presence of Anti-L-Rhamnose Antibodies. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 17236-17246.
- ¹¹⁶ Renaudet, O.; BenMohamed, L.; Dasgupta, G.; Bettahi, I.; Dumy, P. Towards a Self-Adjuvanting Multivalent B and T cell Epitope Containing Synthetic Glycopeptide Cancer Vaccine. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 737-741.
- ¹¹⁷ Bettahi, I.; Dasgupta, G.; Renaudet, O.; Chentoufi, A. A.; Zhang, X.; Carpenter, D.; Yoon, S.; Dumy, P.; BenMohamed, L. Antitumor activity of a self-adjuvanting glyco-lipopeptide vaccine B cell, CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2009**, *58*, 187-200.
- ¹¹⁸ Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G-J. Towards a Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccine: Synthesis and Immunological Evaluation of a Lipidated Glycopeptide Containing the Tumor-Associated Tn Antigen. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 5985-5988.
- ¹¹⁹ Ingale, S.; Wolfert, M. A.; Gaekwad, J.; Buskas, T.; Boons, G-J. Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine. *Nature Chemical Biology* **2007**, *3*, 663-667.
- ¹²⁰ Ingale, S.; Wolfert, M. A.; Buskas, T.; Boons, G-J. Increasing the Antigenicity of Synthetic Tumor-Associated Carbohydrate Antigens by Targeting Toll-Like Receptors. *ChemMedChem* **2009**, *10*, 455-463.
- ¹²¹ Mammen, M.; Choi, S-K.; Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2754-2794.
- ¹²² Lundquist, J. J.; Toone, E. J. The Cluster Glycoside Effect. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 555-578.
- ¹²³ Higashi, N.; Fujioka, K.; Denda-Nagai, K.; Hashimoto, S-i.; Nagai, S.; Sato, T.; Fujita, Y.; Morikawa, A.; Tsuiji, M.; Miyata-Takeuchi, M.; Sano, Y.; Suzuki, N.; Yamamoto, K.; Matsushima, K.; Irimura, T. The Macrophage C-Type Lectin Specific for Galactose/N-Acetylgalactosamine Is an Endocytic Receptor Expressed on Monocyte-derived Immature Dendritic Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 20686-20693.
- ¹²⁴ Denda-Nagai, K.; Kubota, N.; Tsuiji, M.; Kamata, M.; Irimura, T. Macrophage C-type lectin on bone marrow-derived immature dendritic cells is involved in the internalization of glycosylated antigens. *Glycobiology* **2002**, *12*, 443-450.
- ¹²⁵ Yamamoto, K.; Ishida, C.; Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Konami, Y.; Osawa, T.; Irimura, T. Interaction of Immobilized Recombinant Mouse C-Type Macrophage Lectin with Glycopeptides and Oligosaccharides. *Biochemistry* **1994**, *33*, 8159-8166.
- ¹²⁶ Suzuki, N.; Yamamoto, K.; Toyoshima, S.; Osawa, T.; Irimura, T. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *The Journal of Immunology* **1996**, *156*, 128-135.
- ¹²⁷ Napoletano, C.; Ruggetti, A.; Argevig Tarp, M. P.; Coleman, J.; Bennett, E. P.; Picco, G.; Sale, P.; Denda-Nagai, K.; Irimura, T.; Mandel, U.; Clausen, H.; Frati, L.; Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J.; Nuti, M. Tumor-Associated Tn-MUC1 Glycoform Is Internalized through the Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin and Delivered to the HLA Class I and II Compartments in Dendritic Cells. *Cancer Research* **2007**, *67*, 8358-8367.
- ¹²⁸ Freire, T.; Zhang, X.; Dériaud, E.; Ganneau, C.; Vichier-Guerre, S.; Azria, E.; Launay, O.; Lo-Man, R.; Bay, S.; Leclerc, C. Glycosidic Tn-based vaccines targeting dermal dendritic cells favor germinal center B-cell development and potent antibody response in the absence of adjuvant. *Blood* **2010**, *116*, 3526-3536.
- ¹²⁹ Robertson, J. M.; Jensen, P. E.; Evavold, B. D. DO11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope. *The Journal of Immunology* **2000**, *164*, 4706-4712.

- ¹³⁰ Nakajima-Adachi, H.; Koike, E.; Totsuka, M.; Hiraide, E.; Wakatsuki, Y.; Kiyono, H.; Hachimura, S. Two Distinct Epitopes on the Ovalbumin 323-339 Peptide Differentiating CD4⁺T Cells into the Th2 or Th1 Phenotype. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2012**, *76*, 1979-1981.
- ¹³¹ Sun, L.-Z.; Elsayed, S.; Aasent, T. B.; Van Do, T.; Aardal, N. P.; Florvaag, E.; Vaali, K. Comparison between Ovalbumine and Ovalbumine Peptide 323-339 Responses in Allergic Mice: Humoral and Cellular Aspects. *Scandinavian Journal of Immunology* **2010**, *71*, 329-335.
- ¹³² Buus, S.; Colon, S.; Smith, C.; Freed, J. H.; Miles, C.; Grey, H. M. Interaction between a "processed" ovalbumine peptide and Ia molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 3968-3971.
- ¹³³ Chan, M.; Hayashi, T.; Kuy, C. S.; Gray, C. S.; Wu, C. C. N.; Corr, M.; Wrasidlo, W.; Cottam, H. B.; Carson, D. A. Synthesis and Immunological Characterization of Toll-Like Receptor 7 Agonistic Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 1194-1200.
- ¹³⁴ Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Guichard, G.; Hintermann, T.; Jaun, B.; Matthews, J. L.; Schreiber, J. V.; Oberer, L.; Hommel, U.; Widmer, H. β^2 - and β^3 - Peptides with Proteinaceous Side Chains: Synthesis and solution structures of constitutional isomers, a novel helical secondary structure and the influence of solvation and hydrophobic interactions on folding. *Helvetica Chimica Acta* **1998**, 2015-2022.
- ¹³⁵ Guichard, G.; Huc, I. Synthetic foldamers. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 5933-5941.
- ¹³⁶ Salaün, A.; Potel, M.; Roisnel, T.; Gall, P.; Le Grel, P. Crystal Structures of Aza- β^3 -peptides, A New Class of Foldamers Relying on a Framework of Hydrazinoturns. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 3367-3379.
- ¹³⁷ Semetey, V.; Rognan, D.; Hemmerlin, C.; Graff, R.; Briand, J.; Marraud, M.; Guichard, G. Stable Helical Secondary Structure in Short - Chain N,N' - Linked Oligoureas Bearing Proteinogenic Side Chains. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1893-1895.
- ¹³⁸ Zuckermann, R. N. Peptoid Origins. *Biopolymers* **2011**, *96*, 545-555.
- ¹³⁹ Yoo, B.; Kirshenbaum, K. Peptoid architectures: elaboration, actuation, and application. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12*, 714-721.
- ¹⁴⁰ Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 9367-9371.
- ¹⁴¹ Culf, A. S.; Ouellette, R. J. Solid-Phase Synthesis of N-Substituted Glycine Oligomers (α - Peptoids) and Derivatives. *Molecules* **2010**, *15*, 5282-5335.
- ¹⁴² Olivos, H. J.; Alluri, P. G.; Reddy, M. M.; Salony, D.; Kodadek, T. Microwave-Assisted Solid-Phase Synthesis of Peptoids. *Organic Letters* **2002**, *4*, 4057-4059.
- ¹⁴³ Hjelmgård, T.; Faure, S.; Caumes, C.; De Santis, E.; Edwards, A. A.; Taillefumier, C. Convenient Solution-Phase Synthesis and Conformational Studies of Novel Linear and Cyclic α,β -Alternating Peptoids. *Organic Letters* **2009**, *11*, 4100-4103.
- ¹⁴⁴ Olsen, C. A. β -Peptoid "Foldamers" – Why the Additional Methylene Unit? *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96*, 561-566.
- ¹⁴⁵ Hamper, B. C.; Kolodziej, S. A.; Scates, A. M.; Smith, R. G.; Cortez, E. Solid Phase Synthesis of β -Peptoids: N-Substituted β -Aminopropionic Acid Oligomers. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 708-718.
- ¹⁴⁶ Shuey, S. W.; Delaney, W. J.; Shah, M. C.; Scialdone, M. A. Antimicrobial [β]-peptoids by a block synthesis approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 1245-1248.
- ¹⁴⁷ Jahnsen, R. D.; Frimodt-Møller, N.; Franzyk, H. Antimicrobial Activity of Peptidomimetics against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*: A Comparative Study of Different Backbones. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 7253-7261.
- ¹⁴⁸ Caumes, C.; Hjelmgård, T.; Remuson, R.; Faure, S.; Taillefumier, C. Highly Convenient Gram-Scale Solution-Phase Peptoid Synthesis and Orthogonal Side-Chain Post-Modification. *Synthesis* **2011**, *2*, 257-264.
- ¹⁴⁹ Szekely, T.; Caumes, C.; Roy, O.; Faure, S.; Taillefumier, C. α -Peptoids and related compounds: Synthesis and control of the conformation. *Comptes Rendu Chimie* **2013**, *16*, 318-330.
- ¹⁵⁰ Hjelmgård, T.; Faure, S.; Staerk, D.; Taillefumier, C.; Nielsen, J. Expedient Solution-Phase Synthesis and NMR Studies of Arylopeptoids. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, *17*, 4121-4132.
- ¹⁵¹ Aubin, S.; Martin, B.; Delcros, J.; Arlot-Bonnemains, Y.; Baudy-Floc'h, M. Retro Hydrazino-azapeptoids as Peptidomimetics of Proteasome Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 330-334.
- ¹⁵² Crapster, J. A.; Stringer, J. R.; Guzei, I. A.; Blackwell, H. E. Design and conformational analysis of peptoids containing N-hydroxy amides reveals a unique sheet-like secondary structure. *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96*, 604-616.
- ¹⁵³ Jordan, P. A.; Paul, B.; Butterfoss, G. L.; Renfrew, P. D.; Bonneau, R.; Kirshenbaum, K. Oligo(N-alcoxy glycines): Trans substantiating peptoid conformations. *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96*, 617-626.

- ¹⁵⁴ Armand, P.; Kirshenbaum, K.; Falicov, A.; Dunbrack Jr, R. L.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Cohen, F. E. Chiral N-substituted glycines can form stable helical conformations. *Folding and Design* **1997**, *2*, 369-375.
- ¹⁵⁵ Gorske, B. C.; Stringer, J. R.; Bastian, B. L.; Fowler, S. A.; Balckwell, H. E. New Strategies for the Design of Folded Peptoids Revealed by a Survey of Noncovalent Interactions in Model Systems. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 16555-16567.
- ¹⁵⁶ Roy, O.; Caumes, C.; Esvan, Y.; Didierjean, C.; Faure, S.; Tallefumier, C. The tert-Butyl Side Chain: A Powerful Means to Lock Peptoid Amide Bonds in the Cis Conformation. *Organic Letters* **2013**, *15*, 2246-2249.
- ¹⁵⁷ Stringer, J. R.; Crapster, J. A.; Guzei, I. A.; Blackwell, H. E. Extraordinarily Robust Polypyrrolone Type I Peptoid Helices Generated via the Incorporation of α -Chiral Aromatic N-1-Naphthylethyl Side Chains. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 15559-15567.
- ¹⁵⁸ Caumes, C.; Roy, O.; Faure, S.; Tallefumier, C. The Click Triazolium Peptoid Side Chain: A Strong *cis*-Amide Inducer Enabling Chemical Diversity. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 9553-9556.
- ¹⁵⁹ Shah, N. H.; Butterfoss, G. L.; Nguyen, K.; Yoo, B.; Bonneau, R.; Rabenstein, D. L.; Kirshenbaum, K. Oligo(N-aryl glycines): A new twist on structured peptoids. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 16622-16632.
- ¹⁶⁰ Roy, O.; Faure, S.; Thery, V.; Didierjean, C.; Tallefumier, C. Cyclic β -peptoids. *Organic letters* **2008**, *10*, 921-924.
- ¹⁶¹ Santis, E.; Hjelmgaard, T.; Faure, S.; Roy, O.; Didierjean, C.; Alexander, B. D.; Siligardi, G.; Hussain, R.; Jávorf, T.; Edwards, A. A.; Tallefumier, C. Cyclic α,β -peptoids octamers with differing side chain patterns: synthesis and conformational investigation. *Amino Acids* **2011**, *41*, 663-672.
- ¹⁶² Kudirka, R.; Tran, H.; Sanii, B.; Tae Nam, K.; Choi, P. H.; Venkateswaran, N.; Chen, R.; Whitlam, S.; Zuckermann, R. N. Folding of a single-chain, information-rich polypeptoid sequence into a highly ordered nanosheet. *Biopolymers (Peptide Science)* **2011**, *96*, 586-595.
- ¹⁶³ Zuckermann, R. N.; Kadodek, T. Peptoids as potential therapeutics. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **2009**, *11*, 299-307.
- ¹⁶⁴ Miller, S. M.; Simon, R. J.; Ng, S.; Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Moos, W. H. Proteolytic studies of homologous peptide and N-substituted glycine peptoid oligomers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 2657-2662.
- ¹⁶⁵ Schröder, T.; Quintilla, A.; Setzler, J.; Birtalan, E.; Wenzel, W.; Bräse, S. Joint experimental and theoretical investigation of the propensity of peptoids as drug carriers. *WSEAS Transactions on Biology and Biomedecine* **2007**, *4*, 145-148.
- ¹⁶⁶ Astle, J. M.; Udugamasooriya, D. G.; Smallshaw, J. E.; Kodadek, T. A VEGFR2 antagonist and other peptoids evade immune recognition. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2008**, *14*, 223-227.
- ¹⁶⁷ Plé, S.; Figuet, M.; Dumy, P. Template-directed combinatorial surface assembly for protein-protein interaction mimetics. *Comptes Rendus Chimie* **2005**, *8*, 833-839.
- ¹⁶⁸ Saha, U. K.; Roy, R. First Synthesis of N-Linked-Glycopeptoid as New Glycopeptidomimetics. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 3635-3638.
- ¹⁶⁹ Szekely, T.; Roy, O.; Faure, S.; Tallefumier, C. From Glycopeptides to Glycopeptoids. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, 5671-5657.
- ¹⁷⁰ Roy, R. Recent Developments in the Rational Design of Multivalent Glycoconjugates. *Topics in Current Chemistry* **1997**, *187*, 241-274.
- ¹⁷¹ Saha, U.; Roy, R. Glycosylated Peptoids as Prototypical HIV-1 Protease Inhibitors. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 7697-7700.
- ¹⁷² Saha, U.; Roy, R. Synthesis of New Glycopeptidomimetics Based on N-Substituted Oligoglycine bearing an N-Linked Lactoside Side-chain. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, 2571-2573.
- ¹⁷³ Kim, J. M.; Roy, R. New prototypical O-linked-glycopeptidomimetics corresponding to the linkage region of proteoglycans. *Carbohydrate Research*, **1997**, *298*, 173-179.
- ¹⁷⁴ Ahn, M.; Murugan, R. N.; Nan, Y. H.; Cheong, C.; Sohn, H.; Kim, E.-H.; Hwang, E.; Ryu, E. K.; Kang, S. W.; Shin, S. Y.; Bang, J. K. Substitution of the GalNAc- α -O-Thr11 residue in drosocin with O-linked glyco-peptoid residue: Effect on antibacterial activity and conformational change. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 6148-6153.
- ¹⁷⁵ Hu, Y.-J.; Roy, R. Cross-Metathesis of N-Alkenyl Peptoids with O- or C-Allyl Glycosides. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 3305-3308.
- ¹⁷⁶ Khan, S. N.; Kim, A.; Grubbs, R. H.; Kwon, Y.-U. Cross Metathesis Assisted Solid-Phase Synthesis of Glycopeptoids. *Organic Letters* **2012**, *14*, 2952-2955.
- ¹⁷⁷ Dechantsreiter, M. A.; Burkhart, F.; Kessler, H. A Stereoselective Synthesis of a C-Glycosylated Peptoid Building Block. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 253-254.

- ¹⁷⁸ Peri, F.; Dumy, P.; Mutter, M. Chemo- and Stereoselective Glycosylation of Hydroxylamino Derivatives : A Versatile Approach to Glycoconjugates. *Tetrahedron* **1998**, *5*, 12269-12278.
- ¹⁷⁹ Carrasco, M. R.; Alvarado, C. I.; Dashner, S. T.; Wong, A. J.; Wong, M. A. Synthesis of Aminoxy and *N*-alkylaminoxy Amines for Use in Bioconjugation. *Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 5757-5759.
- ¹⁸⁰ Seo, J.; Michaelian, N.; Owens, S. C.; Dashner, S. T.; Wong, A. J.; Barron, A. E.; Carrasco, M. R. Chemoselective and Microwave-Assisted Synthesis of Glycopeptoids. *Organic Letters* **2009**, *11*, 5210-5213.
- ¹⁸¹ Comega, D.; De Riccardis F. An Efficient Modular Approach for the Assembly of S-Linked Glycopeptoids. *Organic Letters* **2009**, *11*, 3898-3901.
- ¹⁸² Yuasa, H.; Kamata, Y.; Kurono, S.; Hashimoto, H. Solid phase synthesis of oligomannopeptoids that mimic the concanavaline A-binding trimannoside. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 2139-2144.
- ¹⁸³ Yuasa, H.; Honma, H.; Hashimoto, H.; Tsunooka, M.; Kojima-Aikawa, K. Pentamer is the minimum structure for oligomannosylpeptoids to bind to concanavalin A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 5274-5278.
- ¹⁸⁴ Kim, J. M.; Roy, R. Oligomeric Glycopeptidomimetics Bearing the Cancer Related T_n-Antigen. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 3487-3490.
- ¹⁸⁵ Roy, R.; Saha, U. K. Rational design of multivalent glycoconjugate ligands. Synthesis of libraries of conformationally flexible rotamers of poly-*N*-linked lactosyl glycines. *Chemical Communications* **1996**, 201-202.
- ¹⁸⁶ Ahn, M.; Murugan, R. N.; Shin, S. Y.; Kim, E.; Lee, J. H.; Kim, H. J.; Bang, J. K. Synthesis of Cyclic Antifreeze Glycopeptide and Glycopeptoids and Their Ice Recrystallization Inhibition Activity. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2012**, *33*, 3565-3570.
- ¹⁸⁷ Jang, H.; Fafarman, A.; Holub, J. M.; Kirshenbaum, K. Click to Fit: Versatile Polyvalent Display on a Peptidomimetic Scaffold. *Organic Letters* **2005**, *7*, 1951-1954.
- ¹⁸⁸ Lee, M. M.; French, J. M.; Disney, M. D. Influencing uptake and localization of aminoglycoside-functionalized peptoids. *Molecular BioSystems* **2011**, *7*, 2441-2451.
- ¹⁸⁹ Lee, M. M.; Childs-Disney, J. L.; Pushechnikov, A.; French, J. M.; Sobczak, K.; Thornton, C. A.; Disney, M. D. Controlling the Specificity of Modularly Assembled Small Molecules for RNA via Ligand Module Spacing: Targeting the RNAs That Cause Myotonic Muscular Dystrophy. *Journal of American Chemical Society* **2009**, *131*, 17464-17472.
- ¹⁹⁰ Lee, M. M.; Pushechnikov, A.; Disney, M. D. Rational and Modular Design of Potent Ligands Targeting the RNA That Causes Myotonic Dystrophy 2. *ACS Chemical Biology* **2009**, *4*, 345-355.
- ¹⁹¹ Ham, H. O.; Park, S. H.; Kurutz, J. W.; Szleifer, I. G.; Messersmith, P. B. Antifouling Glycocalyx-Mimetic Peptoids. *Journal of American Chemical Society* **2013**, *135*, 13015-13022.
- ¹⁹² Hada, N.; Sato, K.; Jin, Y.; Takeda, T. Synthesis of New Glycoclusters Derived from β -Alanine. Part 2: Optionally Modulated Distance between Side-Chain Branched Points. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2005**, *53*, 1131-1135.
- ¹⁹³ Hada, N.; Sonoda, Y.; Takeda, T. Synthesis of a novel glycosphingolipid from the millipede, *Parafontaria laminata armigera*, and the assembly of its carbohydrate moiety into multivalent structures. *Carbohydrate Research* **2006**, *341*, 1341-1352.
- ¹⁹⁴ Sato, K.; Hada, N.; Takeda, T. Syntheses of new peptidic glycoclusters derived from β -alanine: di- and trimerized glycoclusters and glycocluster-clusters. *Carbohydrate Research* **2006**, *341*, 836-845.
- ¹⁹⁵ Sato, K.; Hada, N.; Takeda, T. Synthesis of new peptidic glycoclusters derived from β -alanine. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 9331-9335.
- ¹⁹⁶ Jin, Y.; Hada, N.; Oka, J.; Kanie, O.; Daikoku, S.; Kanie, Y.; Yamada, H.; Takeda, T. Syntheses of Model Compounds Related to an Antigenic Epitope in Pectic Polysaccharides from *Bupleurum falcatum* L. (II). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2006**, *54*, 485-492.
- ¹⁹⁷ Cecioni, S.; Faure, S.; Darbost, U.; Bonnamour, I.; Parrot-Lopez, H.; Roy, O.; Taillefumier, C.; Wimmerová, M.; Praly, J.-P.; Imberty, A.; Vidal, S. Selectivity among Two Lectins: Probing the Effect of Topology, Multivalency and Flexibility of "Clicked" Multivalent Glycoclusters. *Chemistry-A European Journal* **2011**, *17*, 2146-2159.
- ¹⁹⁸ Barra, M. Synthèse et étude de β -peptides glycoconjugués. Application en immunothérapie antitumorale. Thèse de Chimie organique et biologique, Université Blaise Pascal: Clermont-Ferrand, **2009**.
- ¹⁹⁹ Kartha, K. P.R.; Field, R. A. Iodine: A Versatile Reagent in Carbohydrate Chemistry IV. Per-O-Acetylation, Regioselective Acylation and Acetolysis. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11753-11766.
- ²⁰⁰ Hayes, W.; Osborn, H. M. I.; Osborne, S. D.; Rastall, R. A.; Romagnoli, B. One-pot synthesis of multivalent arrays of mannose mono- and disaccharides. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7983-7996.
- ²⁰¹ Yu, H.; Huang, S.; Chokhawala, H.; Sun, M.; Zheng, H.; Chen, X. Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Naturally Occurring and Non-Natural α -2-6-Sialyltransferase with Extremely Flexible Donor-Substrate Specificity. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 3938-3944.

- ²⁰² Mohler, D. L.; Shen, G. The synthesis of tethered ligand dimers for PPAR γ -RXR protein heterodimers. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 2082-2087.
- ²⁰³ Han, S. Y.; Kim, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- ²⁰⁴ Zhang, H.; Curran, D. P. A Short Total of (\pm)-Epimeloscine and (\pm)-Meloscine Enabled by a Cascade Radical Annulation of a Divinylcyclopropane. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 10376-10378.
- ²⁰⁵ Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradinaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sausser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes: (Strept)avidin as Host for Enantioselective Hydrogenation by Achiral Biotinylated Rhodium - Diphosphine Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 14411-14418.
- ²⁰⁶ Coste, J.; Frérot, E.; Jouin, P. Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium salts: Mechanism and Fields of Application. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 2437-2446.
- ²⁰⁷ Frérot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M. N.; Jouin, P. PyBOP® and PyBroP: Two Reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, Aib. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259-270.
- ²⁰⁸ Fara, M. A.; Díaz-Mochón J. J.; Bradley, M. Microwave-assisted coupling with DIC/HOBt for the synthesis of difficult peptides and fluorescent labelled peptides - a gentle heat goes a long way. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 1011-1014.
- ²⁰⁹ Montero, E.; García - Herrero, A.; Asencio, J. L.; Hirai, K.; Ogawa, S.; Santoyo - González, F.; Cañada, F. J.; Jiménez - Barbero, J. The Conformational Behaviour of Non - Hydrolyzable Lactose Analogues: The Thioglycoside, Carbaglycoside, and Carba - Iminoglycoside Cases. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 1945-1952.
- ²¹⁰ Yip, V. L. Y.; Withers, S. G. Family 4 Glycosidases Carry Out Efficient Hydrolysis of Thioglycosides by an α,β - Elimination Mechanism. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 6179-6182.
- ²¹¹ Griesbaum, K. Problems and Possibilities of the Free - Radical Addition of Thiols to Unsaturated Compounds. *Angewandte Chemie International Edition* **1970**, *9*, 273-287.
- ²¹² Köhn, M.; Benito, J. M.; Ortiz, Mellet, C.; Lindhorst, T. K.; García Fernández, J. M. Functional Evaluation of Carbohydrate-Centred Glycoclusters by Enzyme-Linked Lectin Assay: Ligands for Concanavalin A. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 771-777.
- ²¹³ Gress, A.; Völken, A.; Schaald, H. Thio-Click Modification of Poly[2-(3-butenyl)-2-oxazoline]. *Macromolecules* **2007**, *40*, 7928-7933.
- ²¹⁴ Dondoni, A. The Emergence of Thiol-Ene Coupling as a Click Process for Materials and Bioorganic Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 8995-8997.
- ²¹⁵ Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1355-1387.
- ²¹⁶ Durette, P.; Shen, T. Y. Insulin-like, and insulin-antagonistic, carbohydrate derivatives. The synthesis of aryl and alkyl D-mannopyranosides and 1-thio-D-mannopyranosides. *Carbohydrate research* **1980**, *81*, 261-274.
- ²¹⁷ Kozikowski, A. P.; Lee, J. A Synthetic Approach to the Cis-Fused Marine Pyranopyrans, (3E)- and (3Z)-Dactomelyne. X-ray Structure of a Rare Organomercurial. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 863-870.
- ²¹⁸ Zhang, Q.; Lebl, T.; Kulczynska, A.; Boting, N. P. The synthesis of novel hexa-¹³C-labelled glucosinolates from [¹³C₆]-D-glucose. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4871-4876.
- ²¹⁹ Deng, S.; Gangadharmath, U.; Chang, C-W. T. Sonochemistry: A Powerful Way of Enhancing the Efficiency of Carbohydrate Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 5179-5185.
- ²²⁰ Knapp, S.; Myers, D. S. Synthesis of α -GalNAc Thioconjugates from an α -GalNAc Mercaptan. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 2995-2999.
- ²²¹ Knapp, S.; Vocadlo, D.; Gao, Z.; Kirk, B.; Lou, J.; Withers, S. G. NAG-thiazoline, An N-Acetyl- β -hexosaminidase Inhibitor That Implicates Acetamido Participation. *Journal of American Chemical Society* **1996**, *118*, 6804-6805.
- ²²² Knapp, S.; Myers, D. S. α -GlcNAc Thioconjugates. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 3636-3638.
- ²²³ Lubineau, A.; Lortat-Jacob, H.; Gavard, O.; Sarrazin, S.; Bonnafe, D. Synthesis of Tailor-Made Glycoconjugate Mimetics of Heparan Sulfate That Bind IFN- γ in the Nanomolar Range. *Chemistry A European Journal* **2004**, *10*, 4265-4282.
- ²²⁴ Floyd, N.; Vijaykrishnan, B.; Koeppe, J. R.; Davis, B. G. Thiol Glycosylation of Olefinic Proteins: S-Linked Glycoconjugate Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 7798-7802.
- ²²⁵ Dondoni, A.; Massi, A.; Nanni, P.; Roda, A. A New Strategy for Peptide and Protein Glycosylation: Photoinduced Thiol-Ene Coupling. *Chemistry A European Journal* **2004**, *10*, 4265-4282.
- ²²⁶ Fiore, M.; Chambery, A.; Marra, A.; Dondoni, A. Single and dual glycoside clustering around calix[4]arene scaffolds via click thiol-ene coupling and azide-alkyne cycloaddition. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 3910-3913.

- ²²⁷ Fiore, M.; Marra, A.; Dondoni, A. Photoinduced Thiol-Ene Coupling as a Click Ligation Tool for Thiodisaccharide Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 4422-4425.
- ²²⁸ Komba, S.; Kitaoka, M.; Kasumi, T. A New Method of Carbohydrate Synthesis in Both Solution and Solid Phases Using a Special Hydroxy Protecting Group. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, *24*, 5313-5329.
- ²²⁹ Czarniecki, M. Small Molecule Modulators of Toll-like Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 6621-6626.
- ²³⁰ Kurimoto, A.; Hashimoto, K.; Nakamura, T.; Norimura, K.; Ogita, H.; Takaku, H.; Bonnert, R.; McNally, T.; Wada, H.; Isobe, Y. Synthesis and Biological Evaluation of 8-Oxoadenine Derivatives as Toll-like Receptor 7 Agonists Introducing the Antedrug Concept. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 2964-2972.
- ²³¹ Lee, J.; Chuang, T-H.; Redecke V.; She, L.; Pitha, P. M.; Carson, D. A.; Raz, E.; Cottam, H. B. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 6646-6651.
- ²³² Kurimoto, A.; Ogino, T.; Ichii, S.; Isobe, Y.; Tobe, M.; Ogita, H.; Takaku, H.; Sajiki, H.; Hirota, K.; Kawakami, H. Synthesis and evaluation of 2-substituted 8-hydroxyadenines as potent interferon inducers with improved oral bioavailabilities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 1091-1099.
- ²³³ Wu, C. C. N.; Hayashi, T.; Takabayashi, K.; Sabet, M.; Smee, D. F.; Guiney, D. D.; Cottam, H. B.; Carson, D. A. Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 3990-3995.
- ²³⁴ Chan, M.; Hayashi, T.; Kuy, C. S.; Gray, C. S.; Wu, C. C. N.; Corr, M.; Wrasidlo, W.; Cottam, H. B.; Carson, D. A. Synthesis and Immunological Characterization of Toll-Like Receptor 7 Agonistic Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 1194-1200.
- ²³⁵ Chan, M.; Hayashi, T.; Mathewson, R. D.; Yao, S.; Gray, C.; Tawatao, R. I.; Kalenian, K.; Zhang, Y.; Hayashi, Y.; Lao, F. S.; Cottam, H. B.; Carson, D. A. Synthesis and Characterization of PEGylated Toll Like Receptor 7 Ligands. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 445-454.
- ²³⁶ Zheng, Q.; Huang, B.; Danielsen, K.; Shukla, R.; Nagy, T. Facile and Practical Synthesis of 2,6-Dichloropurine. *Organic Process Research & Development* **2004**, *8*, 962-963.
- ²³⁷ Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D. Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 10030-10074.
- ²³⁸ Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- ²³⁹ Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhida, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Bis(2-sulfanylethyl)amino Native Peptide Ligation. *Organic Letters* **2010**, *12*, 5238-5241.
- ²⁴⁰ Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Organic Letters* **2000**, *2*, 1939-1941.
- ²⁴¹ Pattabiraman, V. R.; Ogunkoya, A. O.; Bode, J. W. Chemical Protein Synthesis by Chemoselective α -Ketoacid-Hydroxylamine (KAHA) Ligations with 5-Oxaproline. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 5114-5118.
- ²⁴² Englebrechtsen, D. R.; Garnham, B.; Alewood, P. F. A Cassette Ligation Strategy with Thioether Replacement of Three Gly-Gly Peptide Bonds: Total Chemical Synthesis of the 101 Residue Protein Early Pregnancy Factor [$\psi(\text{CH}_2\text{S})^{28-29,56-57,76-77}$]. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 5883-5890.
- ²⁴³ Baca, M.; Kent, S. B. H. Catalytic contribution of flap-substrate hydrogen bonds in "HIV-1 protease" explored by chemical synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 11638-11642.
- ²⁴⁴ Gaertner, H. F.; Offord, R. E.; Cotton, R.; Timms, D.; Camble, R.; Rose, K. Chemo-enzymatic Backbone Engineering of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 7224-7230.
- ²⁴⁵ Valverde, I. E.; Lecaille, F.; Lalmanach, G.; Aucagne, V.; Delmas, A. F. Synthesis of a Biologically Active Triazole-Containing Analogue of Cystatin A Through Successive Peptidomimetic Alkyne-Azide Ligations. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 718-722.
- ²⁴⁶ Assem, N.; Natarajan, A.; Yudin, A. K. Chemoselective Peptidomimetic Ligation Using Thioacid Peptides and Aziridine Templates. *Journal of American Chemical Society* **2010**, *132*, 10986-10987.
- ²⁴⁷ Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition* **1978**, *17*, 522-524.
- ²⁴⁸ Rivera, J. M.; Martín, T.; Rebek, J. Jr. Chiral Softballs: Synthesis and Molecular Recognition Properties. *Journal of American Chemical Society* **2001**, *123*, 5213-5220.
- ²⁴⁹ Hou, J-L.; Yi, H-P.; Shao, X-B.; Li, C.; Wu, Z-Q.; Jiang, X-K.; Wu, L-Z.; Tung, C-H.; Li, Z-T. Helicity Induction in Hydrogen-Bonding-Driven Zinc Porphyrin Foldamers by Chiral C₆₀-Incorporating Histidines. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 796-800.
- ²⁵⁰ Pryor, K. E.; Rebek, J. Jr. Multifunctionalized Glycolurils. *Organic Letters* **1999**, *1*, 39-42.

- ²⁵¹ Guo, Z.; Shao, N. Glycopeptide and Glycoprotein Synthesis Involving Unprotected Carbohydrate Building Block. *Medicinal Research Reviews* **2005**, *25*, 655-678.
- ²⁵² Xue, J. Guo, Z. Efficient Synthesis of Complex Glycopeptides Based on Unprotected Oligosaccharides. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 2713-2719.
- ²⁵³ Wen, S.; Guo, Z. Unprotected Oligosaccharides as Phase Tags: Solution-Phase Synthesis of Glycopeptides with Solid-Phase Workups. *Organic Letters* **2001**, *3*, 3773-3776.
- ²⁵⁴ Shao, N.; Xue, J.; Guo, Z. Chemical Synthesis of CD25 Glycopeptides Containing the Acid-Labile Fucosyl Linkage. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 9003-9011.
- ²⁵⁵ Huisgen, R. Kinetics and reaction mechanisms: selected examples from the experience of forty years. *Pure and Applied Chemistry* **1989**, *61*, 613-628.
- ²⁵⁶ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- ²⁵⁷ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M.; Peptidotriazoles on Solid Phase:[1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- ²⁵⁸ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- ²⁵⁹ Aucagne, V.; Valverde, I. E.; Marceau, P.; Galibert, M.; Dendane, N.; Delmas, A. F. Towards the Simplification of Protein Synthesis: Iterative Solid-Supported Ligations with Concomitant Purifications. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 11320-11324.
- ²⁶⁰ Hua, Y.; Flood, A. H. Click chemistry generates privileged CH hydrogen-bonding triazoles: the latest addition to anion supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1262-1271.
- ²⁶¹ Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, Y. C. D.; Ghadiri, M. R. Heterocyclic Peptide Backbone Modifications in an α -Helical Coiled Coil. *Journal of American Chemical Society* **2004**, *126*, 15366-15367.
- ²⁶² Ko, E.; Liu, J.; Perez, L. M.; Lu, G.; Schaefer, A.; Burgess, K. Universal Peptidomimetics. *Journal of American Chemical Society* **2011**, *133*, 462-477.
- ²⁶³ Grandjean, C.; Boutonnier, A.; Guerreiro, C.; Fournier, J.-M.; Mulard, L. A. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 7123-7132.
- ²⁶⁴ Baker, W. L.; Goode, J.; Cooper, L. Estimation of Hydrogen Peroxide Formed and Residual Ascorbate in the Copper Catalysed Oxidation Reaction of Ascorbate. *Mikrochimica Acta* **1992**, *106*, 143-152.
- ²⁶⁵ Uchida, K.; Kawakishi, S. Selective Oxidation of Imidazole Ring in Histidine Residues by the Ascorbic Acid - Copper Ion System. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1986**, *138*, 659-665.
- ²⁶⁶ Schöneich, C. Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2000**, *21*, 1093-1097.
- ²⁶⁷ Liu, Y.; Sun, G.; David, A.; Sayre, L. M. Model Studies on the Metal-Catalyzed Protein Oxidation: Structure of a Possible His-Lys Cross-Link. *Chemical Research in Toxicology* **2004**, *17*, 110-118.
- ²⁶⁸ Thornalley, P. J. Glutathione-dependent detoxification of α -oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferation activity of glyoxalase I inhibitors. *Chemico-Biological Interactions* **1998**, *111-112*, 137-151.
- ²⁶⁹ Shangari, N.; Chan, T. S.; Chan, K.; Wu, S. H.; O'Brien, P. J. Copper-catalyzed ascorbate oxidation results in glyoxal/AGE formation and cytotoxicity. *Molecular Nutrition & Food Research* **2007**, *51*, 445-455.
- ²⁷⁰ Nagaraj, R. H.; Sell, D. R.; Prabhakaram, M.; Ortwerth, B. J.; Monnier, V. M. High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 10257-10261.
- ²⁷¹ Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 9879-9883.
- ²⁷² Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Organic Letters* **2004**, *6*, 2853-2855.
- ²⁷³ Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3+2] Cycloaddition. *Journal of American Chemical Society* **2003**, *125*, 3192-3193.
- ²⁷⁴ Gaulier, C.; Hospital, A.; Legeret, B.; Delmas, A. F.; Aucagne, V.; Cisnetti, F.; Gautier, A. A water soluble Cu^I-NHC for CuAAC ligation of unprotected peptides under open air conditions. *Chemical Communications* **2012**, *48*, 4005-4007.
- ²⁷⁵ Kumar, A.; Li, K.; Cai, C. Anaerobic conditions to reduce oxidation of proteins and to accelerate the copper-catalyzed "Click" reaction with a water-soluble bis(triazole) ligand. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 3186-3188.

- ²⁷⁶ Good, N. E.; Winget, D.; Winter, W.; Connoly, T. N.; Izawa, S.; Singh, R. M. M. *Hydrogen Ion Buffers for Biological Research* **1966**, 5, 467-477.
- ²⁷⁷ Sokolowska, M.; Bal, W. Cu(II) complexation by "non-coordinating" N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005**, 99, 1653-1660.
- ²⁷⁸ Mazal, D.; Lo-Man, R.; Bay, S.; Pritsch, O.; Dériaud, E.; Ganneau, C.; Medeiros, A.; Ubillos, L.; Obal, G.; Berois, N.; Bollati-Fogolin, M.; Leclerc, C.; Osinaga, E. Monoclonal antibodies toward different Tn-amino acid backbones display distinct recognition patterns on human cancer cells. Implications for effective immuno-targeting of cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy* **2013**, 62, 1107-1122.

Résumé

Les antigènes saccharidiques associés aux tumeurs (TACAs) sont considérés comme des marqueurs de cellules tumorales. Le développement de candidats vaccins synthétiques capables d'induire des réponses immunitaires robustes dirigées contre ces TACAs est un vaste champ d'investigation depuis de nombreuses années. Dans cette optique, mon travail s'est principalement focalisé sur la conception d'un candidat vaccin à trois composantes qui peut activer spécifiquement les cellules dendritiques, les cellules T_H et les cellules B.

La première partie de la thèse consistait à effectuer une étude approfondie des méthodes submonomère et monomère en solution pour accéder à une plateforme β -tripeptide *O*- α -GalNAc (épitope des cellules B), servant de mime du cluster trimérique de l'antigène Tn (GalNAc- α -*O*-Ser/Thr). Pour renforcer la stimulation du système immunitaire, un agoniste du récepteur Toll 7 (TLR7) préalablement synthétisé (exprimé par les cellules dendritiques) a été ensuite couplé à cette plateforme par l'intermédiaire de l'acide amino-caproïque, pris comme espaceur. L'édifice candidat vaccin a ensuite été complété par conjugaison au peptide OVA 323-339 (épitope des cellules T_H) grâce à la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire CuAAC. Enfin, l'aptitude du candidat vaccin à induire une réponse anti-Tn a été évaluée par l'équipe du Pr. C. Leclerc de l'Institut Pasteur de Paris.

En parallèle de ces études, nous avons mis au point des conditions de ligation multivalente par couplage thiol-ène (TEC) pour l'obtention de peptoides *S*-glycosylés.

Mots clés: Anticorps, Cancer, Candidat vaccin, CuAAC, Glycoluster Tn, peptotide, TACA, TEC, TLR7.

Abstract

Tumor-Associated Carbohydrate Antigen (TACAs) are considered as cancer cells markers. The development of synthetic vaccine candidates which are able to induce a robust immune response against these TACAs is a field of great interest since many years. In this context, my work has been focused mainly on the design of a three-component vaccine candidate with the ability to activate specifically dendritic cells, T_H cells and B cells.

The first part of the thesis consisted in making a deep study on the submonomer and monomer methods for solution-phase synthesis of a β -tripeptoid *O*- α -GalNAc scaffold (B epitope). Its role is to mimic the Tn (GalNAc- α -*O*-Ser/Thr) trimeric cluster which is naturally present on tumor cells surface. To strengthen the stimulation of the immune system, a TLR7 agonist (receptor express by dendritic cells) has been, firstly, coupled through an amino-caproic acid spacer. The vaccine candidate has been next completed by conjugation with the OVA 323-339 peptide (T_H epitope) using the Copper-catalized Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC). Finally, the capacity of this construction to generate anti-Tn response have been evaluated by the groupe of C. Leclerc of Institut Pasteur of Paris.

At the same time, we have also developed conditions for multivalent ligations using thiol-ene coupling (TEC) to obtain a β -tripeptoid *S*- α -GalNAc scaffolds.

Keywords: Antibody, Cancer, CuAAC, peptoid, TACA, TEC, TLR7, Tn glycocluster, Vaccine candidate.